

LAPORAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL TAHUN ANGGARAN 2010



EKSPLORASI PROTEIN SPESIFIK *PREGNANCY ASSOCIATED
GLYCOPROTEIN* (PAG) AIR SUSU SAPI PERAH SEBAGAI
BIOMARKER UNTUK PENGEMBANGAN DIAGNOSIS
KEBUNTINGAN SECARA LABORATORIS

OLEH

Dr. ABDUL SAMIK, drh., M.Si
ERMA SAFITRI, drh., M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Tentang Kegiatan Peneliiian Strategis Nasional dan Multi Tahun Universitas
Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR/2010,
Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA
2010

LAPORAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL TAHUN ANGGARAN 2010



EKSPLORASI PROTEIN SPESIFIK *PREGNANCY ASSOCIATED
GLYCOPROTEIN (PAG)* AIR SUSU SAPI PERAH SEBAGAI
BIOMARKER UNTUK PENGEMBANGAN DIAGNOSIS
KEBUNTINGAN SECARA LABORATORIS

OLEH

Dr. ABDUL SAMIK, drh., M.Si
ERMA SAFITRI, drh., M.Si.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga, sesuai dengan Surat Keputusan Rektor
Tentang Kegiatan Penelitian Strategis Nasional dan Multi Tahun Universitas
Airlangga Tahun Anggaran 2010 Nomor : 553/H3/KR/2010,
Tanggal 11 Maret 2010

UNIVERSITAS AIRLANGGA
2010

LEMBAR IDENTAS DAN PENGESAHAN

1. JUDUL : Eksplorasi Protein Spesifik *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) Air Susu Sapi Perah Sebagai Biomarker Untuk Pengembangan Diagnosis Kebuntingan Secara Laboratoris
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap : Dr. Abdul Samik, drh., M.Si.
 - b. Jenis Kelamin : Laki-Laki
 - c. NIP : 131 925 904
 - d. Pangkat/Golongan : Penata Tk. I/III-d
 - e. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
 - f. Bidang Keahlian : Biologi Reproduksi
 - g. Fakultas/Jurusan : Kedokteran Hewan/Reproduksi Veteriner
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Tim Peneliti

NO	NAMA PENELITI	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1	Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.	Biologi Reproduksi	FKH-UNAIR	Universitas Airlangga
2	Erma Safitri, M.Si., Drh.	Biologi Reproduksi	FKH-UNAIR	Universitas Airlangga

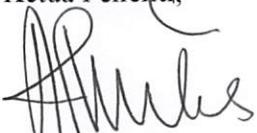
3. Pendanaan dan Jangka Waktu Penelitian

- a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 2 tahun (2010-2011)
- b. Biaya yang diusulkan : Rp. 80.000.000,00
- c. Biaya yang disetujui tahun 2010 : Rp. 20.000.000,00

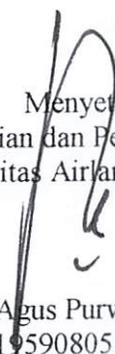
Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga Surabaya

Surabaya, 15 Nopember 2010
Ketua Peneliti,


Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.
NIP. 130 687 305


Dr. Abdul Samik, M.Si., Drh.
NIP. 131 925 904

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat
Universitas Airlangga Surabaya


Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., M.Si.
NIP. 195908051987011001

RINGKASAN

EKSPLORASI PROTEIN SPESIFIK *PREGNANCY ASSOCIATED GLYCOPROTEIN* (PAG) AIR SUSU SAPI PERAH SEBAGAI BIOMARKER UNTUK PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KEBUNTINGAN SECARA LABORATORIS

Oleh

Abdul Samik, Erma Safitri

Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Unair Surabaya

Diagnosa kebuntingan dini pada sapi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah dan air susu induk seperti *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dan (b) dengan mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine atau air susu selama kebuntingan seperti *progesterone*, *estrone sulphate*.

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

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah : Mengidentifikasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) yang merupakan protein awal kebuntingan dari air susu sapi perah bunting, Melakukan isolasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dari air susu sapi perah bunting, Melakukan karakterisasi biokimiawi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dari air susu sapi perah bunting.

Metode penelitian meliputi : karakterisasi PAG dari sapi perah bunting melalui teknik ekstraksi protein PAG air susu dengan metode *Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) , uji spesifikasi protein

PAG dari air susu dengan metode *Western Blot* dan isolasi protein PAG dengan metode elektroelusi.

Hasil yang diperoleh adalah *Pegnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dapat dideteksi dan diisolasi dari air susu sapi perah bunting, Berat molekul *Pegnancy Associated Glycoprotein* (PAG) yang diperoleh adalah 59,88 kDa.

Saran yang dapat diajukan adalah dengan melihat karakter kimiawi dari PAG perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk memproduksi anti-PAG yang dapat digunakan untuk diagnosis kebuntingan sapi perah secara laboratories.

ABSTRAK

EKSPLORASI PROTEIN SPESIFIK *PREGNANCY ASSOCIATED GLYCOPROTEIN* (PAG) AIR SUSU SAPI PERAH SEBAGAI BIOMARKER UNTUK PENGEMBANGAN DIAGNOSIS KEBUNTINGAN SECARA LABORATORIS

Abdul Samik dan Erma Safitri

Kelestarian sumberdaya ternak akan terkait dengan aspek peningkatan kelahiran dan memperpendek jarak antar kelahiran. Salah satu upaya untuk memperpendek *calving interval* pada sapi perah adalah melakukan diagnosis kebuntingan secara dini setelah terjadinya perkawinan. Pengembangan metode diagnosis kebuntingan dini ternak dapat dilakukan dengan melihat substansi spesifik yang terdapat dalam air susu induk bunting yaitu *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG). Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan metode diagnosis kebuntingan dini pada sapi perah. Penelitian tahun pertama ini dilakukan melalui tahapan isolasi dan karakterisasi biokimiawi protein PAG air susu sapi perah bunting dengan metode SDS-PAGE dan Western Blot serta mengukur kadar protein PAG dari air susu sapi perah bunting.

Hasil SDS-PAGE isolat PAG air susu sapi perah terdapat 10 pita protein dengan berat molekul antara 37,85-210,51 kDa. Uji spesifisitas dengan *Western blot* diperoleh pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal anti-PAG sehingga diyakini sebagai protein PAG dengan berat molekul 59,88 kDa. Air susu sapi perah bunting mengandung kadar protein PAG sebesar 6480 µg/ml.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa air susu sapi perah bunting mengekspresikan protein PAG dengan berat molekul 59,88 kDa dengan kadar protein sebesar 6480 µg/ml.

Kata kunci : air susu sapi perah bunting, berat molekul PAG, kadar protein PAG

ABSTRACT

PREGNANCY ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (PAG) PROTEIN EXPLORATION FROM MILK OF PREGNANT DAIRY CATTLE AS FOR EARLY PREGNANCY DIANOSTIC LABORATORIES

Abdul Samik and Erma Safitri

The sustainability of livestock sources is related to birth rate increase and the shortening of kidding interval. One of the efforts to shorten the calving interval in dairy cattle is by conducting early diagnosis of pregnancy after mating. The development of early pregnancy diagnosis method in livestock can be undertaken by observing specific substance presents in the milk of pregnant livestock, i.e. the Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG). The objective of this study was to isolate PAG protein from milk of pregnant dairy cattle as the base for developing one of early pregnancy test in cattle.

This study was conducted by following these stages: 1) Biochemical isolation and characterization of PAG protein from the milk of pregnant dairy cattle and 2) measuring milk PAG level of pregnant dairy cattle. The results of SDS-PAGE of milk pregnant dairy cattle PAG isolate revealed 10 protein bands with molecular weights between 37.85 and 210.51 kDa. Specificity test with Western blot indicated protein band recognized by anti-PAG monoclonal antibody, believed to be PAG protein with molecular weight of 59.88 kDa. Milk of pregnant dairy cattle contain PAG protein 6480 µg/ml.

Based on the results, it can be concluded that milk of pregnant dairy cattle express PAG protein with molecular weight 59,88 kDa and PAG protein level 6480 µg/ml.

Keywords: milk of dairy cattle, molecular weight of PAG, PAG protein level

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan berkah dan rahmatNya sehingga penulisan laporan penelitian ini dapat selesai tepat waktu.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kami tujukan kepada Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan kepada kami untuk melakukan penelitian ini.

Kepada para sejawat anggota peneliti kami ucapkan terima kasih atas kerjasamanya dan juga kepada UPT ternak Singosari dan Branggahan Kediri 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, Nopember 2010

Peneliti

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
ABSTRAK	iii
PRAKATA	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Perumusan Masalah	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Siklus Reproduksi Sapi	4
2.1.1. Pubertas.....	4
2.1.2. Siklus Birahi..	5
2.1.3. Perkawinan.....	8
2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur	9
2.1.3.2. Transpor Gamet	10
2.1.3.3. Transpor Spermatozoa	11
2.1.3.4. Transpor Spermatozoa pada Serviks	13
2.1.3.5. Transpor Spermatozoa dalam Uterus	14
2.1.3.6. Transpor Spermatozoa dalam Oviduk	14
2.1.3.7. Kontrol Endokrin terhadap Transpor Spermatozoa	15
2.1.3.8. Hiperaktivasi dari Motilitas Spermatozoa	15
2.1.4. Kebuntingan	16
2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta	17
2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan	19
2.1.4.3. Peran Hormon Dalam Proses Kebuntingan	22
2.1.5. Diagnosis Kebuntingan	23
2.1.5.1. Palpasi Rektal	24
2.1.5.2. Penggunaan USG	24

2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron	25
2.1.5.4. Penggunaan Radiografi	25
2.1.5.5. Pemeriksaan Antigen Embrio	26
2.1.6. Kelahiran	26
2.1.6.1. Stadium Persiapan	27
2.1.6.2. Stadium Pengeluaran Fetus	28
2.1.6.3. Stadium Pengeluaran Plasenta	29
2.1.6.4. Hormon Yang Berperan Dalam Proses Kelahiran	30
2.2. Pregnancy Associated Glycoprotein.....	34
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.3. Tujuan Penelitian	35
3.4. Manfaat Penelitian	35
BAB IV METODE PENELITIAN.....	36
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	36
4.2 Hewan Coba, Bahan dan Alat Penelitian.....	36
4.3. Metode Penelitian	37
4.3.1. Sinkronisasi Birahi dan Inseminasi Buatan Sapi Perah	39
4.3.2. Isolasi Protein Air Susu	39
4.3.3. Metode Identifikasi PAG dengan SDS-PAGE	39
4.3.4. Metoda Identifikasi Protein PAG dengan Western Blot	41
4.3.5. Metode Isolasi Protein PAG dengan Elektroelusi	42
4.3.6. Metode Pemeriksaan Isolat PAG dengan Biuret	43
4.3.6.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA	43
4.3.6.2. Pembuatan Kurva Standar BSA	43
4.3.6.3. Pengukuran Kadar Protein PAG	43
4.6. Analisis Data	44
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN.....	45
5.1. Identifikasi PAG dengan SDS-PAGE	45
5.2. Uji Spesifisitas Protein PAG dengan <i>Western Blot</i>	47
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	48
6.1 Kesimpulan	48
6.2 Saran	48
DAFTAR PUSTAKA	49

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Lama siklus birahi, lama birahi dan ovulasi	6
Tabel 4.1.	Nilai protein standar produksi Biorad	41
Tabel 5.1.	Berat molekul pita-pita protein air susu sapi perah bunting	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar 4.1.	Bagan rancangan penelitian karakterisasi <i>Pregnancy Associated Glycoprotein</i> (PAG) dari air susu sapi perah bunting.....	38
Gambar 5.1.	Pita-pita protein air susu sapi bunting	45
Gambar 5.2.	Kurva hubungan antara Rf dengan log BM protein standar	46
Gambar 5.3.	Hasil western blot isolat PAG dengan BM 59,88	47

Jawa Timur merupakan propinsi di Indonesia yang memiliki sapi potong dan perah dengan populasi tertinggi dan juga merupakan pemasok kebutuhan daging sapi dan susu terbesar secara nasional. Program pembibitan dirasakan sebagai kebutuhan yang sangat mendesak oleh karena itu berdasarkan pengamatan lalu lintas ternak terutama pengeluaran ternak ke luar propinsi cukup besar sehingga dikhawatirkan untuk masa mendatang populasi ternak besar di Jawa Timur makin berkurang. Melihat kenyataan atau kondisi peternakan tersebut dirasa perlu untuk mengembangkan dan meningkatkan efisiensi reproduksi sehingga populasi ternak besar bisa terjaga.

Kendala yang sering dihadapi peternak sapi 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 dan sinkronisasi 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 dini pada sapi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu (a) dengan mendeteksi substansi spesifik yang terdapat di dalam darah dan air susu induk seperti *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dan (b) dengan mendeteksi substansi non spesifik yang ada di dalam darah, urine atau air susu selama kebuntingan seperti *progesterone*, *estrone sulphate* (Hafez, 2000).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Perkembangan populasi ternak ruminansia seperti sapi, kambing dan domba di Indonesia belum mencapai keadaan yang menggembirakan bahkan cenderung menurun. Propinsi Jawa Timur sejak tahun 1999 sampai 2003 terjadi penurunan populasi ternak besar yaitu kuda turun 3,24 %, sapi perah 5,86 %, kerbau 5 % sedangkan sapi potong naik 0,02 %. Hal ini disebabkan oleh adanya banyaknya permintaan akan protein hewani yang berasal dari daging ternak sapi, kambing dan domba namun tidak diimbangi dengan peningkatan populasi ternak tersebut.

Kebutuhan daging sapi nasional pada tahun 2005 mencapai 499.000 ton (setara dengan 1.500.000 ekor sapi), 350.000 ekor/tahun (setara 105.000 ton daging) disuplai oleh industri *fattening* dan 1.150.000 ekor sapi (setara 345.000 ton daging) dipenuhi oleh peternakan sapi rakyat dan sisanya 50.000 ton daging dipenuhi dari impor. Mengingat pertumbuhan populasi sapi potong nasional pada tahun 2005 sebesar 0,98 % maka akan terjadi pengurasan atau eksploitasi yang tidak terkendali terhadap ternak-ternak lokal rakyat yang pada akhirnya akan mengganggu keseimbangan populasi ternak nasional.

Demikian juga untuk kebutuhan konsumsi susu nasional masih jauh dari cukup. Kebutuhan konsumsi susu nasional pada tahun 2006 sebesar 896.791 ton/tahun. Sedangkan produksi susu nasional pertahun sebesar 577.626 ton, sehingga masih terdapat kekurangan produksi susu nasional sebesar 319.165 ton/tahun (Direktur Jendral Peternakan, 2005).

Selama ini yang telah dilakukan untuk mendiagnosa dini kebuntingan sapi adalah dengan mendeteksi adanya substansi non spesifik selama kebuntingan. Pada kenyataannya, deteksi kebuntingan dini dengan menggunakan substansi non spesifik seperti *progesterone* dan estrone sulphate dengan menggunakan teknik RIA (Nalbandov, 1990) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA. Adapun tujuan umum dari penelitian ini adalah karakterisasi dan isolasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) air susu sapi perah untuk pengembangan diagnosis kebuntingan secara laboratoris.

1.2. Perumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan adalah :

1. Apakah protein *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) diekspresikan dan dapat diisolasi oleh air susu sapi perah bunting ?
2. Bagaimana profil kadar protein *Pregnancy Associated Glycoproteins* (PAG) air susu sapi perah bunting ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Siklus Reproduksi Sapi

Siklus reproduksi ialah rangkaian kejadian biologik kelamin yang berlangsung secara sambung-menyambung hingga terlahir generasi baru dari suatu makhluk hidup. Siklus reproduksi meliputi pubertas, musim kelamin, siklus birahi dan aktivitas seksual post partum. Beberapa faktor yang mempengaruhi siklus reproduksi adalah lingkungan, genetik, fisiologik, hormonal dan psychososial. Tingkat fertilitas suatu individu dimulai pada waktu pubertas dan dipertahankan selama beberapa tahun sebelum kemudian menurun selama proses ketuaan.

2.1.1. Pubertas

Pubertas atau dewasa kelamin ialah periode kehidupan makhluk jantan dan betina dimana proses-proses reproduksi mulai terjadi yang ditandai oleh kemampuan untuk pertama kalinya memproduksi benih. Kejadian pubertas didasari oleh penyesuaian secara bertahap antara peningkatan aktivitas gonadotropik dan kemampuan gonad secara simultan dalam steroidogenesis dan gametogenesis. Pubertas pada sapi dicapai pada umur 8-13 bulan.

Sebelum masa pubertas, terjadi sekresi androgen dari kelenjar adrenal, androstendion, dehidroepiandrosteron dan dehidroepiandrosteron sulfat. Ini tidak berhubungan dengan perubahan dalam sekresi kortisol dan aldosteron dari kelenjar

adrenal. Pada saat dimulai pubertas, konsentrasi gonadotropin dalam sirkulasi meningkat baik dalam peningkatan amplitudo maupun frekuensi dari impuls periodik dari gonadotropin.

Pada hewan jantan, sebagai respon dari sekresi gonadotropin, testosteron secara progresif meningkat dari kadar yang rendah menuju ke kadar dewasa. Setiap terjadi pulsus LH setiap satu jam kemudian diikuti oleh peningkatan sekresi testosteron. Peningkatan testosteron yang tinggi dalam darah pada akhirnya akan menekan sekresi gonadotropin oleh umpan balik negatif (*negative feedback effect*).

Pada hewan betina, sekresi estrogen secara bertahap akan meningkat sejalan dengan respons dari gonadotropin pubertal yang meningkat sesuai dengan pembentukan folikel antral dimulai. Hal ini terjadi pada sapi dan domba. Di lain pihak, kadar estrogen hanya meningkat pada babi 11 hari setelah lahir, pada waktu folikel antral pertama tampak, sementara sekresi gonadotropin dimulai 3 minggu sebelumnya.

2.1.2. Siklus Birahi

Siklus birahi ialah ritme fungsi faal tertentu dari sistem kelamin, yang terdapat pada hewan ternak setelah masa pubertas dicapai. Pada hewan ternak, perkawinan terbatas hanya pada waktu birahi yang kemudian diikuti dengan terjadinya ovulasi. Pada manusia dan primata, perkawinan tidak terbatas selama siklus menstruasi, sedangkan ovulasi terjadi pada pertengahan siklus.

Panjang siklus birahi pada sapi berkisar 20-21 hari. Secara lengkap panjang siklus birahi, lama birahi dan waktu ovulasi dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 2. 1. Lama siklus birahi, lama birahi dan ovulasi

HEWAN	SIKLUS BIRAH	LAMA BIRAH	OVULASI
Domba	16-17 hari	24-36 jam	24-30 jam*
Kambing	21 hari	32-36 jam	30-36 jam*
Babi	19-21 hari	48-72 jam	35-45 jam*
Sapi	21-22 hari	18-19 jam	10-11 jam**
Kuda	19-25 hari	4-8 hari	1-2 hari***
Kerbau	19-25 (21 hari)	12-96 (42 jam)	

* Dari dimulainya birahi

** Setelah birahi berakhir

*** Sebelum akhir birahi

Siklus birahi secara kasar dapat dibagi menjadi empat periode menurut perubahan-perubahan yang tampak maupun yang tidak tampak dari luar selama siklus birahi yaitu: proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan pemacuan pertumbuhan folikel oleh FSH. Folikel yang sedang bertumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung hormon estrogen yang lebih banyak. Hormon estrogen inilah yang akan mempengaruhi suplai darah ke saluran alat kelamin dan meningkatkan pertumbuhannya. Vulva agak membengkak dan vestibulum menjadi berwarna kemerahan karena adanya kongesti pembuluh darah. Bagian vagina dan cerviks membesar karena pembengkakan sel-sel mukosa dan dimulailah sekresi lendir dari saluran serviks. Proestrus pada sapi berlangsung selama 2 - 3 hari. Pada periode

ini biasanya sapi akan menolak bila dinaiki pejantan maupun sesama betinanya, tetapi akan berusaha menaiki betina yang lainnya (Jumping heat).

Periode estrus merupakan masa keinginan kawin, periode ini ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik. Sapi akan sering menguak dan biasanya tidak tenang, nafsu makan dan memamah biak menurun. Vulva makin membengkak dan mukosa vulva berwarna merah keunguan, pengeluaran lendir yang terang tembus kurang begitu jelas. Selama periode ini folikel terus berkembang dengan cepat. Gejala fisik yang jelas tampak dari luar dan sudah diketahui oleh peternak adalah 3 A (Abang, Abuh dan Anget). Apabila sapi betina tersebut dilePAG dipadangan maka akan mencari pejantan untuk mengawininya dan akan menaiki sesama betina. Sapi yang tepat berada pada periode birahi ini apabila dikumpulkan dengan sesama betina akan memperlihatkan tingkah diam bila dinaiki (Standing heat). Gejala ini adalah yang terpenting dari gejala-gejala yang lain. Ekor biasanya diangkat dan lendir transparan menggantung atau melekat pada pangkal ekor. Vulva membengkak, lunak, oedematous dan relaks.

Pada pemeriksaan vaginal, mukosa vagina merah dan oedematous. Lendir birahi tidak begitu banyak yang terdapat di dalam vagina berasal dari sel-sel selaput lendir serviks dibawah pengaruh estrogen. Pada puncak birahi viskositas lendir tersebut paling rendah dan elastistasnya pengalirannya paling tinggi, apabila lendir tersebut dioleskan tipis pada gelas obyektif dan dikeringkan, maka NaCl yang terlihat dalam kadar tinggi akan berkristalisasi dan memberikan pola arborisasi yang khas. Os servikalis eksterna berwarna merah jambu, oedematous, agak mengendor dan membuka pada waktu estrus. Pembuatan preparat ulas vagina selama proestrus dan estrus menunjukkan peningkatan jumlah sel-sel yang

berkornifikasi, tetapi variasi perubahan tersebut terlampau besar antara individu kambing sehingga cara ini tidak dapat dipakai sebagai indikasi birahi. Kira-kira 3 jam setelah perkawinan jumlah leukosit meningkat pesat. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh adanya semen di dalam alat reproduksi hewan betina.

Metestrus ditandai dengan berhentinya birahi yang tiba-tiba. Pada periode ini terjadi ovulasi dengan pecahnya folikel dan rongga folikel secara berangsur-angsur akan mengecil, pengeluaran lendir dari serviks juga telah berhenti.

Periode diestrus merupakan periode akhir dari siklus birahi, dimana ditandai dengan berkembangnya korpus luteum dan menghasilkan hormon progesteron. Oleh pengaruh hormon progesteron inilah endometrium menebal, kelenjar dan urat daging uterus berkembang, sebagai persiapan uterus untuk menampung dan memberi makan embrio serta pembentukan plasenta bila terjadi kebuntingan. Bila ovum tidak terbuahi (tidak terjadi kebuntingan), korpus luteum akan tetap berfungsi selama kurang lebih 19 hari. Selama diestrus vagina terlihat pucat dan kering, mukus sedikit serta agak liat

2.1.3. Perkawinan

Di samping 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 (Anonimous, 1986). 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 (Djanuar, 1985). Balai Inseminasi Lembang (1984) membagi saat inseminasi menjadi lima kategori yaitu; terlalu cepat, baik, baik sekali, sedang dan terlambat. Selanjutnya disebutkan pula bahwa kemungkinan konsepsi (kebuntingan) bila diinseminasi pada saat-saat ; 1). permulaan birahi adalah 44 %, 2). pertengahan birahi 82 %, 3). akhir birahi 75 %, 4). enam jam sesudah birahi 62.5 %, 5). 12 jam sesudah birahi 32.5 %, 6). 18 jam sesudah birahi 28 %, 7). 24 jam sesudah birahi 12 %, 8). 36 jam sesudah birahi 8 % dan 48 jam sesudah birahi 0 %.

Penelitian yang dilakukan oleh Pusat Inseminasi Buatan dan penelitian tandingannya memiliki hasil yang hampir sama. Hasil tersebut pada umumnya menunjukkan angka konsepsi yang lebih rendah dari pada angka konsepsi tertinggi bila sapi-sapi tersebut dikawinkan pada awal birahi atau lebih dari enam jam sesudah birahi. Hasil tertinggi akan didapatkan bila sapi-sapi tersebut dikawinkan terhitung diantara pertengahan birahi sampai akhir birahi. Menurut anjuran Trimerer (1948) dibuat suatu patokan, bila sapi itu mulai birahi pada waktu sore hari sesudah jam 12.00 siang supaya dikawinkan sebelum jam 12.00 pada hari berikutnya.

2.1.3.1. Penangkapan Sel Telur

Lapisan massa cumulus oophorus yang mengandung oosit dan sel corona menempel pada stigma sehingga mudah disentuh oleh kinosilia dari fimbriae. Mula-mula ovum ditranspor dengan sendirinya melalui ostium dan kemudian beberapa milimeter dari ampula gerakannya dipengaruhi oleh silia.

Mekanisme fisiologik penangkapan sel telur yang baru diovolasikan oleh oviduk, bergantung pada beberapa faktor: 1. Struktur yang khas fimbriae dari infundibulum dan hubungannya dengan permukaan ovarium pada saat ovulasi; 2. Pola pembebasan cumulus oophorus yang terdapat pada sel telur pada waktu ovulasi; 3. Biofisik yang terkandung dalam cairan folikuler yang mempengaruhi cumulus oophorus dan; koordinasi kontraksi dari fimbriae dan ligamen utero ovarica.

Pada waktu ovulasi, fimbriae penuh dengan darah sehingga mendekatkan pada permukaan ovarium oleh aktivitas otot dari mesotubarium. Fimbriae dan infundibulum terdiri dari struktur erektil yang kaya akan pembuluh darah dan jaringan otot. Selama estrus aliran darah ke fimbriae meningkat, sehingga menyebabkan tepi atau ujung dari fimbriae menjadi oedematus. Aktivitas kontraktil dari fimbriae, oviduk dan ligamen sebagian dikordinasi oleh mekanisme hormonal dimana didalamnya terlibat perbandingan estrogen dan progesteron.

2.1.3.2. Transpor Gamet

Sel Spermatozoa dan sel telur mammalia mengalami beberapa perubahan maturasi sebagai persiapan untuk fertilisasi. Sel spermatozoa dan sel telur mempunyai selang waktu hidup (fertil life) yang relatif pendek (20-48 jam), terjadinya fertilisasi bergantung terutama pada transpor dari gamet di dalam saluran reproduksi betina. Transpor gamet di dalam saluran reproduksi betina merupakan kerja dari kontraksi saluran tersebut yang diatur oleh sistem saraf pusat, refleks dan aktivitas hormonal. Substansi farmakologik aktif dalam semen

merangsang dan mengendalikan kontraksi saluran reproduksi betina. Silia dari oviduk dan sekresinya, serviks, uterotubal junction dan ampulary isthmus junction memegang peranan yang belum jelas.

2.1.3.3. Transpor Spermatozoa

Setiap spesies hewan berbeda tempat deposit semen di dalam saluran reproduksi betina pada waktu kopulasi. Pada sapi dan domba, karena volume semen yang kecil maka didepositkan di ujung kranial dari vagina dan sebagian di serviks. Pada kuda dan babi yang besar volumenya, didepositkan melalui kanalis servikalis yang relakasi ke dalam uterus.

Sel spermatozoa dalam transportnya terbilang unik, karena ditranspor melalui beberapa cairan yang berbeda fisiologik dan biokimianya misalnya, cairan testis, cairan epididimis, seminal plasma, cairan vagina, mukus serviks, cairan uterus, cairan oviduk dan cairan peritoneal.

Faktor fisiokemikal dan immunologik dalam vagina dan serviks pada waktu inseminasi memegang peranan penting dalam daya kehidupan spermatozoa dan transpor ke uterus dan oviduk. Sekresi vagina menyebabkan spermatozoa tidak bergerak selama 1-2 jam setelah inseminasi. Plasma seminal memainkan peranan penting dalam transpor dan fisiologik spermatozoa.

Dikenal tiga tahapan dalam transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina yaitu transpor sperma secara cepat, kolonisasi dan lambat.

Transpor cepat dilakukan segera setelah inseminasi, sel spermatozoa akan menembus jonjot-jonjot lendir serviks yang kemudian secara cepat ditranspor

melalui kanalis servikalis. Fase ini berlangsung 2 - 10 menit dan dibantu oleh motilitas spermatozoa, demikian juga peningkatan aktivitas kontraksi dari myometrium dan mesosalphinx selama koitus. Beberapa spermatozoa segera mencapai ostium serviks 1,5-3 menit setelah inseminasi. Jadi beberapa spermatozoa dapat mencapai tempat pembuahan secara cepat. Diketahui bahwa pembuahan terjadi hanya bila sejumlah tertentu spermatozoa sampai pada tempat pembuahan.

Transpor spermatozoa juga dilakukan secara berkeloni. Sejumlah kumpulan spermatozoa terjebak dalam lipatan mukosa yang kompleks dari kriptaserviks. Proses ini didorong oleh kenyataan bahwa jonjot dari lendir serviks menolong spermatozoa langsung ke kriptaserviks dimana reserve tersebut dibentuk. Walaupun beberapa sel leukosit diproduksi pada serviks tetapi masih lebih sedikit daripada yang terdapat pada vagina dan uterus. Pelepasan dari sel spermatozoa yang terjadi secara berkeloni ini penting bagi fertilitas. Timbunan sel spermatozoa paling banyak terdapat pada oviduk. Spermatozoa meninggalkan serviks melalui transpor aktif (motilitas) dan transpor pasif melalui kontraksi serviks dan uterus.

Pada spesies hewan dimana semen diejakulasikan pada kornua uteri, timbunan spermatozoa terjadi di utero tubal junction, seperti misalnya pada babi, atau pada kelenjar uterus seperti pada anjing. Pada beberapa spesies hewan transportasi spermatozoa dipengaruhi oleh prostaglandin yang terdapat dalam semen.

Transpor spermatozoa secara pelan terjadi setelah timbunan spermatozoa pada reservoir telah cukup. transpor ini berjalan secara pelan bergantung pada motilitas spermatozoa dan aktivitas kontraksi myometrium dan mesosalpinx.

2.1.3.4. Transpor Spermatozoa pada Serviks

Mukosa serviks penuh dengan alur-alur dan celah-celah kript) yang mempunyai beberapa fungsi: a) Menerima spermatozoa yang menembus untuk fertilisasi dan menghambat migrasi pada suatu fase dari siklus. b) Merupakan tempat reservoir spermatozoa. c) Melindungi spermatozoa dari lingkungan vagina yang tidak cocok dan dari fagositosis leukosit. d) Memberikan energi yang diperlukan spermatozoa. e) Sebagai saringan spermatozoa yang cacat atau tidak motil. f) Kemungkinan berperan dalam kapasitas spermatozoa.

Lendir serviks yang berkumpul pada vagina, mengandung cairan yang berasal dari endometrium, oviduk, folikel dan peritoneal. Selain itu juga mengandung leukosit, reruntuhan sel-sel dari uterus dan serviks serta epitel vagina. Lendir serviks pada saat ovulasi, terbentuk dari makromolekul yang merupakan ikatan dari unit yang terdiri dari 100 - 1000 mikromolekul. Mikromolekul tersebut berangka oligosakarida dan ikatan asam sialat. Molekul organik dengan berat rendah termasuk gula (glukose, maltose dan mannose) serta asam amino. Lendir serviks juga mengandung protein, mikro elemen dan enzim. Keseimbangan fisiologik dari steroid yang berasal dari ovarium penting dalam inisiasi dan mempertahankan populasi spermatozoa dalam serviks setelah inseminasi, terutama setelah sinkronisasi birahi. Ketidak-seimbangan hormon progesteron dan estrogen dapat mempengaruhi transport spermatozoa dengan melalui cara

mempengaruhi kuantitas dan kualitas terciri dari sekresi lendir serviks atau motilitas dari saluran reproduksi.

2.1.3.5. Transpor Sperma dalam Uterus

Aktivitas kontraksi dari vagina dan myometrium memegang peranan utama dalam transpor spermatozoa melalui uterus. Sejumlah besar spermatozoa menyerbu kedalam kelenjar uterus. Hal ini merangsang endometrium mengeluarkan lekosit yang akan memfagosit sejumlah spermatozoa hidup maupun yang mati.

2.1.3.6. Transpor Sperma dalam Oviduk

Oviduk mempunyai fungsi yang unik dalam transpor spermatozoa dan sel telur, dimana kedua fungsi transpor yang berlawanan tersebut dapat dijalankan secara simultan. Pola dan kecepatan transpor spermatozoa di dalam oviduk dikontrol oleh beberapa mekanisme seperti peristaltik dan antiperistaltik dari otot oviduk, kontraksi yang kompleks dari lipatan mukosa oviduk dan mesosalphinx, cairan yang ada dan aliran balik yang ditimbulkan oleh aliran silia. Pada oviduk burung dara, dan kura-kura, terdapat dua sistem kinosilia yang satu mengarah pada ovarium dan yang lainnya mengarah pada kloaka.

Pola transpor spermatozoa melalui oviduk diselenggarakan oleh peristaltik dan antiperistaltik otot dan kontraksi dari lipatan mukosa serta mesosalphinx. Frekuensi dan amplitudo kontraksi dari otot oviduk sirkular dan longitudinal mesosalphinx dan mesotubarium dikontrol oleh hormon-hormon dari ovarium, adrenergik dan nonadrenergik, serta beberapa komponen plasma seminal seperti

prostaglandin. Pola dan amplitudo kontraksi bervariasi pada tempat (segmen) yang berbeda dari oviduk. Pada Isthmus, kontraksi peristaltik dan antiperistaltik bersifat segmental dan hampir menerus (bersinambungan), sedangkan pada ampulla gelombang kontraksi peristaltik berlangsung segmental dan lebih lemah. Spermatozoa ditranspor ke ampulla dengan cara perubahan relaksasi dari ampullary-Isthmus junction atau oleh gerakannya sendiri, sampai sekarang belum diketahui.

2.1.3.7. Kontrol Endokrin terhadap Transpor Spermatozoa

Hormon-hormon yang berasal dari ovarium diketahui memengaruhi transpor spermatozoa pada saluran reproduksi betina. Hormon yang berasal dari ovarium mempengaruhi a) struktur dan ultrastruktur serta aktivitas sekresi dari epitel serviks, uterus dan oviduk. b) aktivitas kontraksi dari otot uterotusbal. c) Kualitas dan kuantitas karakteristik dari sekresi lendir servik dan sekresi uterus serta oviduk. Perubahan-perubahan juga terjadi pada kandungan protein, aktivitas enzim, komposisi elektrolit, tegangan permukaan dan konduktivitas dari cairan tersebut. Peningkatan dari sejumlah estrogen endogen selama fase preovulasi atau pemberian sintetik estrogen akan menyebabkan perubahan pada lendir servik dimana akan lebih encer. Transpor spermatozoa di dalam saluran reproduksi betina juga dikontrol oleh hormon oksitosin dan sistem syaraf simpatik serta para simpatik. Epinephrin, acetylcholin, histamin dan beberapa vaso konstriktor berpengaruh dalam kontraksi uterus, tetapi pengaruhnya ringan.

2.1.3.8. Hiperaktivasi dari Motilitas Spermatozoa

Kecepatan spermatozoa dan pola motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh tempat /segmen dari saluran reproduksi betina dimana spermatozoa tersebut ditranspor. Percepatan spermatozoa terjadi terutama pada oviduk mendekati waktu ovulasi dan mungkin berkaitan dengan kaPAGitasi spermatozoa dan reaksi akrosom. Secara normal spermatozoa ditahan pada isthmus dari oviduk. Karakteristik fisik dari isthmus adalah sempitnya lumen, viskositas lendir isthmus, temperatur lokal yang lebih rendah, gerak dari silia prouterin dan kontraksi otot oviduk. Interaksi fisiologik antara spermatozoa dan lingkungan isthmus termasuk mempengaruhi motilitas spermatozoa. Keaktifan berenang spermatozoa juga dapat dipengaruhi dengan mengencerkan media yang terdapat pada isthmus dengan cara memberikan media buatan atau cairan ampula. Bila pyruvat terdapat dalam media tersebut, hiperaktivitas flagela dirangsang, tidak demikian bila hanya glukosa saja yang terdapat pada media tersebut. Ion K^+ dan pyruvat mempunyai kebalikan terhadap motilitas spermatozoa. Bila konsentrasi ion K^+ ditingkatkan, maka akan menghambat sedangkan bila piruvat meningkat, maka akan merangsang motilitasnya. Hal ini penting bagi penyiapan media untuk fertilisasi invitro.

Keasaman (pH) cairan pada saluran reproduksi betina berbeda-beda. pH dari vagina umumnya adalah asam yaitu sekitar 4.0; lendir serviks 8.4; uterus 7.8; cairan ovikuk 7.1-7.3 pada fase folikuler dan 7.5-7.8 pada fase luteal.

2.1.4. Kebuntingan

Periode kebuntingan dimulai dengan pembuahan dan berakhir dengan dilahirkannya anak yang hidup. Pertumbuhan dan perkembangan individu baru

selama kebuntingan merupakan hasil perbanyakan, pertumbuhan, perubahan susunan serta fungsi sel. Peristiwa tadi mempengaruhi perubahan-perubahan tertentu, beberapa diantaranya merupakan ciri dari tahap perkembangannya.

Perkembangan anak dalam kandungan berlangsung terus menerus, namun kebuntingan dinyatakan terdiri dari tiga tahap yaitu : periode ovum, periode embrio dan periode fetus.

Periode ovum adalah periode yang dimulai dari fertilisasi sampai implantasi, periode embrio dimulai dari implantasi sampai saat dimulainya pembentukan alat-alat tubuh bagian dalam. Kemudian disambung dengan periode fetus yaitu periode yang dimulai dari terbentuknya alat-alat bagian dalam, bagian ekstrimitas sampai dilahirkan (Menurut Robert, 1956). Sedangkan menurut Hafez (1974) mengatakan bahwa periode ovum dimulai dari ovum diovasikan sampai terjadi fertilisasi, Periode embrio dimulai sejak terjadi fertilisasi, implantasi sampai terbentuknya alat-tubuh bagian dalam dan selanjutnya disebut periode fetus.

2.1.4.1. Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Plasenta

Setelah terjadi implantasi embrio pada bagian endometrium uterus, selanjutnya terjadi pertautan trophoblast ke dalam endometrium. Nutrisi awal untuk embrio adalah berasal dari uterine milk (histotroph/ susu uterus). Seiring dengan perkembangan embrio maka terbentuk jalinan tenunan tubuh embrio dengan induknya yang berfungsi untuk penyaluran nutrisi dari induk ke fetus dan membuang zat-zat yang dikeluarkan oleh anak menuju induk. Jalinan ini disebut plasenta. Plasenta terbagi menjadi tiga bagian yaitu bagian dalam yang menyelubungi fetus disebut amnion, bagian yang terdapat diantara chorion dan

amnion adalah alantois. Selaput yang menyelubungi fetus di bagian terluar disebut chorion.

Chorion adalah bagian lapis paling luar dari trophoblast. Terbentuknya jaringan plasenta karena penjalaran trophoblast amat tergantung dari spesies hewan. Pada sapi, kambing dan domba lapis sel paling luar dari trophoblast yang bersentuhan dengan epitel karunkula segera melarutkan sel-sel epitel vili trophoblast, sedang pada permukaan endometrium yang tidak didapati karunkula tidak terjadi pembentukan plasenta. Plasenta yang terbentuk pada *sapi, kambing dan domba* disebut Cotyledonaria. Pada *babi dan kuda*, endometriunya tidak mempunyai karunkula, maka plasenta yang terbentuk dari hubungan superficial dari epitel endometrium dengan epitel chorion. Bentuk plasenta ini disebut Difusa. Dua tipe lain dari plasenta adalah Zonaria terdapat pada *anjing* dan Diskoidalis terdapat pada *keras*, manusia, tikus, marmot, kelinci.

Berdasarkan struktur histologisnya, tipe plasenta dapat dibedakan antar spesies berdasarkan jumlah lapisan tenunan sel yang memisahkan aliran darah induk dan aliran darah anak. Epitheliochoriale adalah plasenta difusa dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh dua lapis epitel, dua lapis endotel dan dua lapis tenunan pengikat dari induk dan dari anak. Syndesmochoriale pada plasenta cotyledonaria, yang mempunyai satu lapis tenunan epitel lebih tipis dari epitheliochoriale. Endotheliochoriale pada plasenta zonaria dimana darah induk dan anak dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel dari anak yaitu endotel, tenunan pengikat dan tenunan epitel trophoblast, sedang dari induk hanya satu tenunan sel endotel saja. Hemochoriale adalah plasenta diskoidale dimana darah anak dan induk dipisahkan oleh tiga lapis tenunan sel yang semuanya berasal dari trophoblast.

Hemoendotelial pada plasenta diskoidale (kelinci) yaitu darah induk dan anak hanya dipisahkan oleh satu lapis tenunan sel endotel dari pembuluh darah anak.

Lama kebuntingan dihitung sejak fertilisasi sampai lahir, oleh karena fertilisasi tidak dapat diketahui dengan tepat, biasanya kebuntingan dimulai sejak perkawinan yang terakhir sampai terjadi kelahiran. Periode kebuntingan dihitung mulai saat fertilisasi sampai kelahiran. Berdasarkan hal ini maka perhitungan yang dipakai peternak tidak tepat bisa lebih panjang beberapa jam samapi beberapa hari. Terjadinya fertilisasi pada setiap spesies tidak sama, misalnya pada sapi terjadi 11 sampai 15 jam setelah inseminasi. Lama kebuntingan dipengaruhi oleh faktor-faktor maternal, gentik, fetus dan lingkungan.

Pembesaran volume uterus pada permulaan kebuntingan sebagian besar disebabkan oleh pertambahan cairan amnion dan alantois. Pada pertengah kebuntingan pertambahan volume cairan sama dengan volume fetus. Sedang pada kebuntingan akhir, volume uterus sebagian besar dipenuhi oleh fetus.

2.1.4.2. Perubahan Alat Kelamin Betina Selama Kebuntingan

Vulva dan Vagina

Setelah fertilisasi, vulva dan vagina belum mengalami perubahan, pada saat umur kebuntingan 6 – 7 bulan terlihat edema vulva terutama pada sapi dara dan pada sapi yang telah beranak edema vulva baru terlihat pada umur kebuntingan 8,5 – 9 bulan. Perubahan vagina terlihat adanya pertambahan vaskularisasi mukosa vagina.

Servik

Perubahan pada servik terjadi setelah fertilisasi yaitu kriptakripta servik menghasilkan lendir kental, semakin tua umur kebuntingan semakin kental lendir yang dihasilkan. Perubahan lain adalah terjadi kontraksi tonus dari muskulatur servik menjelang kelahiran. Pada sapi, 2 – 5 hari sebelum partus otot servik merileks dan servik mulai terbuka.

Uterus

Perubahan yang terjadi pada uterus setelah fertilisasi adalah peningkatan vaskularisasi pada endometrium, kelenjar-kelenjarnya tumbuh lebih panjang dan berkelok serta akan menghasilkan susu uterus (*histotroph*), muskulatur uterus lebih tenang karena pengaruh progesteron. Setelah implantasi penyaluran nutrisi dari induk ke anak serta zat buangan dari anak ke induk lebih lancar karena adanya hubungan yang lebih erat dari tropoblas dengan pembuluh darah pada endometrium. Karena perluasan tropoblas, maka uterus juga mengalami pertumbuhan muskulatur dan jaringan kolagen.

Pada sapi, kuda dan kerbau, pada umur kebuntingan 90 hari kornua bunting mulai turun. Kebuntingan 4 bulan apex kornua yang mengandung fetus telah sampai ke dasar rongga abdomen. Kebuntingan 5 bulan, dasar rongga abdomen seluruhnya dipenuhi uterus yang bunting. Dengan bertambahnya umur kebuntingan maka jarak dinding uterus dengan rektum menjadi bertambah dekat dan pada kebuntingan 9 bulan dinding uterus dan rektum saling bersentuhan.

Setelah pertukaran nutrisi melalui pembuluh darah berlangsung baik, pertumbuhan embrio menjadi lebih cepat. Tidak ada spesies yang mempunyai struktur pembuluh

darah dalam plasentanya yang bersifat langsung dari anak ke induk, selalu ada lapisan tenunan yang menyekat aliran darah anak dan aliran darah induk, fungsi penyekat ini untuk menyeleksi zat-zat yang mengalir dari induk ke anak. Untuk melindungi sekat dari kerusakan karena terjadinya kenaikan tekanan darah induk atau anak, maka dalam plasenta terdapat sistem *shunt* yaitu hubungan tembus dari kapiler ke kapiler.

Ovarium

Setelah ovulasi terbentuklah kawah bekas folikel yang pecah disebut *korpus haemorrhagicum* atau *korpus rubrum*. Selanjutnya terjadi proses luteinisasi dari sel granulosa dan sel teka membentuk sel-sel baru disebut sel lutein, sel lutein berproliferasi dan akhirnya memenuhi seluruh kawah dan membentuk jendolan diatas permukaan ovarium disebut *korpus luteum*.

Pada sapi dan domba, korpus luteum tumbuh pada hari ke-5 – 6 setelah ovulasi. Bila tidak ada kebuntingan, korpus luteum akan diregresikan oleh prostaglandin F2 alfa yang dihasilkan oleh endometrium uterus. Selanjutnya korpus luteum yang tidak berfungsi akan berdegenasi dan berubah menjadi jaringan ikat berwarna putih mengkilap disebut *korpus albican*. Bila terjadi kebuntingan maka korpus luteum tetap berfungsi dan disebut korpus luteum graviditatum dan akan berfungsi terus hingga akhir kebuntingan, terjadi pada sapi, domba, kambing, babi dan kerbau.

Pada kuda, korpus luteum awal hanya berfungsi sampai bulan ke-5. Pada hari ke-40 ovarium kuda membentuk 10 – 15 folikel yang beberapa diantaranya ovulasi. Kuda tidak mengalami birahi karena KL yang pertama masih berfungsi

menghasilkan progesteron. Dari folikel ini muncul KL baru yang jumlah cukup banyak satu ovarium bisa mengandung 3 – 5 KL baru. Korpus luteum baru ini disebut KL asesoris. Pada bulan ke-5, KL lama maupun KL asesoris akan regresidan pada bulan ke-7 KL tinggal sisa-sisanya, progesteron untuk merawat kebuntingan seluruhnya dihasilkan oleh plasenta. Pada akhir masa kebuntingan aktivitas ovarium dalam membentuk folikel meningkat sehingga kadar estrogen yang dihasilkannya juga meningkat, hal ini menyebabkan kuda yang hendak melahirkan menjadi birahi, tetapi secara klinis tidak terlalu jelas karena diimbangi dengan adanya progesteron dalam peredaran darah.

2.1.4.3. Peranan Hormon dalam Proses Kebuntingan

Kelenjar endokrin yang terlibat dalam fase kebuntingan adalah korpus luteum, folikel, plasenta, hipotalamus, dan hipofisa. Kelenjar endokrin pendukung adalah tyroid dan adrenal. Hipotalamus dan hipofisa merupakan kelenjar pengatur sedang yang memegang peranan utama adalah korpus luteum, penghasil progesterone, plasenta, penghasil progesterone dan estrogen dan folikel sebagai penghasil estrogen (hanya jelas pada kuda, pada spesies lain yang bunting tidak ada folikel tumbuh).

Korpus luteum memegang peranan penting untuk pertumbuhan makhluk hidup, mulai implantasi sampai pertengahan kebuntingan. Hampir semua ternak bunting, plasentanya memproduksi estrogen. Hal ini dapat dianalisa dari urin. Kuda, urinenya mengandung estron, estradiol 17 alfa dan beta. , kambing dan domba, didapatkan estradiol 17 alfa, babi, estron dan pada sapi, estron dan estradiol 17 alfa.

Pada kuda, plasentanya menghasilkan steroid dan gonadotropin (PMSG). PMSG berperan menghasilkan folikel , setelah ovulasi akan membentuk korpus luteum asesoris yang akan menghasilkan progesterone untuk memelihara kebuntingan. Pada semua ternak, kebuntingan tua, KL akan regresi, kadar progesterone akan menurun terutama menjelang kelahiran sedang kadar estrogen akan meningkat sesuai dengan penambahan plasenta. Pola kenaikan kadar estrogen dan berat plasenta terjadi pada semua ternak tetapi tidak berlaku bagi progesteron. Pada wanita, progesterone tetap tinggi sampai kelahiran, sedang pada ternak menurun menjelang kelahiran.

2.1.5. Diagnosis Kebuntingan

Tanda umum terjadinya kebuntingan pada ternak adalah tidak kembalinya birahi setelah dikawinkan (*Non return*) tetapi hal ini ada kemungkinan tidak bunting tetapi adanya korpus luteum persisten atau gangguan hormonal lainnya.

arena keinginan manusia untuk mengetahui kebuntingan hewannya secara dini setelah dikawinkan maka ada beberapa teknik untuk mengetahui kebuntingan pada ternak.

1. PalPAGi Rektal
2. Penggunaan Ultrasonographi (USG)
3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron
4. Penggunaan Radiografi
5. Pemeriksaan Antigen Embrio

2.1.5.1. Palpasi Rektal

Pemeriksaan kebuntingan yang paling umum dilakukan adalah palpasi ovarium dan uterus dengan tangan yang dimasukkan lewat rektum. Tujuan palpasi rektal adalah mendeteksi adanya pembesaran uterus yang bunting, memeriksa adanya fetus, arteri uterina media serta kotiledon yang membesar. Palpasi ovarium ditujukan untuk mengetahui adanya KL.

Pemeriksaan kebuntingan dengan palpasi rektal dapat dilakukan pada umur kebuntingan 35 hari tetapi diagnosis semakin akurat setelah 45 – 60 hari kebuntingan. Palpasi rektal ini dapat dilakukan pada sapi, kerbau dan kuda, sedang pada domba dan kambing untuk diagnosis kebuntingan dapat dengan cara palpasi abdominal.

2.1.5.2. Penggunaan USG

Fraser et al.(1968) telah menggunakan alat periksa (ultrasonik) yang ditempelkan pada abdomen untuk mendeteksi fetus mulai kebuntingan 9 minggu. Prinsip Ultrasound adalah suara ultra dengan frekuensi sangat tinggi dan panjang gelombang sangat pendek yang dipantulkan dari benda yang bergerak ke sumber transmisi dengan frekuensi yang sedikit berubah. Ini memungkinkan untuk mendeteksi aspek pulsus fetus (jantung atau tali pusat), arteri uterus. Sinyal ultrasonik yang dipantulkan dari benda yang bergerak itu biasanya diperkeras dan dianalisis dengan pendengaran, dapat diubah menjadi gambaran visual pada layar monitor. Angka keberhasilan alat ini dalam mendiagnosa kebuntingan sampai 93%.

2.1.5.3. Pemeriksaan Konsentrasi Hormon Progesteron

Pemeriksaan dengan mengetahui konsentrasi hormon progesteron bisa menggunakan sampel dari air susu atau plasma darah. Konsentrasi progesteron dalam air susu biasanya sejajar dengan yang ada dalam darah. Pemeriksaan dengan sampel air susu hanya cocok untuk sapi perah sedang untuk sapi dara dan potong kurang sesuai. Pemeriksaan progesteron dalam air susu dapat dilakukan pada hari ke-21 – 24 setelah inseminasi. Uji negatif ternyata 85 – 100% tepat pada hari ke 24 sedang uji positif hanya 80%.

Pengukuran konsentrasi progesteron dalam plasma darah perifer dilakukan dalam upaya mendeteksi perbedaan dalam fungsi ovarium antara ternak bunting dan tidak bunting. Pemeriksaan dapat dilakukan pada hari ke 17 – 18 kebuntingan dengan angka keberhasilan 85%. Pemeriksaan konsentrasi progesteron baik dari air susu maupun plasma darah dapat dilakukan dengan teknik *Radioimmuno Assay (RIA)*.

2.1.5.4. Penggunaan Radiografi

Radiografi fetus didasarkan atas deteksi prose penulangan dengan memakai sinar X setelah hari ke-50 masa perkembangan fetus, angka keberhasilannya 90 – 95% pada tiga bulan setelah kawin. Tidak ada pengaruh yang merusak dari teknik ini pada induk atau anak domba, dapat digunakan untuk mendeteksi anak kembar dua atau tiga tetapi alat ini jarang digunakan karena mahal.

2.1.5.5.Pemeriksaan Antigen Embrio

Pendekatan lain yang dapat memenuhi syarat pendugaan untuk tes kebuntingan pada sapi adalah dengan mendeteksi adanya antigen khusus yang dihasilkan oleh embrio. Antigen khusus ini mungkin dihasilkan oleh lapisan sel tropoblas dan dapat dideteksi keberadaannya dalam darah induk.

2.1.6. Kelahiran

Yang dimaksud kelahiran adalah proses fisiologik dimana uterus yang bunting mengeluarkan anak dan plasenta melalui saluran kelahiran. Proses kelahiran anak ditunjang oleh perejanan kuat dari urat daging uterus, perut dan diafragma. Sebelum kelahiran didahului dengan beberapa tanda-tanda akan datangnya kelahiran.

Pada sapi, terjadi relaksasi bagian servik terutama ligamentum sacrospinosum dan tuberosum, yang akan menyebabkan urat daging diatas pelvis mengendor, Jika diraba urat daging di kanan dan kiri pangkal ekor terasa kendor dan lunak. Relaksasi urat daging pangkal ekor sekali-sekali disertai dengan kenaikan pangkal ekor, vulva menjadi lebih bengkak, kelenjar ambing membengkak edematous, kolostrum sudah diproduksi yakni cairan dari kelenjar ambing yang kental berwarna kekuningan. Selain tanda-tanda diatas, terjadi perubahan pada lendir servik dan pembukaan servik. Pada kebuntingan tua, lendir servik bersifat serous. Pada 3 – 4 hari menjelang partus, lendir servik menjadi lebih banyak volumenya dan bersifat cair. Pembukaan servik dapat diikuti dengan memasukkan jari ke dalam lumen servik.

Proses kelahiran dapat dibagi menjadi tiga tahap, yaitu tahap permulaan atau tahap persiapan dan tahap pengeluaran fetus dan tahap pengeluaran plasenta. Tahap perejanan terbagi lagi menjadi 3 yaitu persiapan perejanan, perejanan kuat untuk mengeluarkan fetus dan perejanan untuk mengeluarkan plasenta. Pada kelahiran normal, tahap permulaan berlangsung lebih lama dari tahap perejanan. Tahap permulaan dapat berlangsung beberapa jam atau hari sedang tahap perejanan dapat berlangsung dalam hitungan menit.

2.1.6.1. Stadium Persiapan

Stadium ini ditandai dengan intensitas kontraksi dari myometrium. Mula-mula kontraksi terjadi pada setiap 15 menit sekali dengan lama kontraksi hanya 15 sampai 30 detik. Kontraksi dimulai dari apex kornua menuju servik, akibatnya cairan dan membran allantois dan amnion menyusup ke lumen servik. Servik yang telah mereleks sedikit demi sedikit terbuka. Kontraksi semakin lama semakin kuat dan jaraknya semakin pendek. Kontraksi terjadi setiap 3 menit sekali dan lamanya 20 – 40 detik.

Pada sapi, stadium persiapan lamanya berkisar 2 – 6 jam tetapi bisa sampai 24 jam. Akhir dari stadium persiapan servik terbuka luas sehingga servik, vagina dan vulva menjadi satu saluran yang tidak jelas batas-batasnya. Membran allantois menyembul keluar vulva dan dapat pecah sehingga cairan allantois akan mengalir keluar. Sementara kantong amnion yang berisi fetus telah masuk ke dalam pelvis dan menyembul sedikit dari celah vulva. Jika kontraksi uterus terus berjalan, kepala dan kaki depan fetus akan masuk ke dalam ruang pelvis maka terjadilah rangsangan ke pusat dan sumsum tulang punggung yang diteruskan berupa refleksi

ke urat daging perut dan diafragma. Bila urat daging perut dan diafragma terlibat dan berkontraksi bersama-sama myometrium maka stadium persiapan selesai dilanjutkan dengan stadium pengeluaran fetus.

2.1.6.2. Stadium Pengeluaran Fetus

Stadium kedua ini bila tidak terjadi hambatan akan berlangsung sangat singkat. Stadium persiapan berakhir dengan tersembulnya kantong allantois keluar dari vulva. Kantong ini dapat tetap intak atau dapat pula sobek sehingga cairannya mengalir keluar. Tetapi jika kontraksi uterus terus berlangsung, kantong amnion akan masuk ke ruang pelvis beserta fetusnya dan akan mendesak kantong allantois lebih keluar dan pecah. Selanjutnya kantong amnion menyembul keluar. Kantong amnion berwarna abu-abu mengkilat, lebih tebal dan lebih kuat, tidak mudah pecah. Besarnya kantong amnion pada sapi bisa sebesar tinju sampai sebesar kelapa dan berayun-ayun beberapa lama sampai perejanan kuat terjadi.

Jika fetus telah masuk ke ruang pelvis maka fetus merupakan benda padat yang menimbulkan keregangan pada ruang pelvis maupun jalan kelahiran (servik, vagina, vulva). Rangsangan yang diterima oleh gerbang pelvis ini akan diteruskan ke susunan saraf pusat selanjutnya timbul refleks merejan yang kuat yang dilakukan secara bersamaan oleh myometrium, urat daging perut dan diafragma. Dengan perejanan yang semakin kerap dan kuat ini, fetus dalam jalan kelahiran didorong kuat untuk keluar. Mula-mula kantong amnion pecah cairan mengalir keluar yang mempermudah fetus meluncur keluar dari jalan kelahiran.

Kuda, sapi, domba dan kambing mempunyai tahap dan stadium pengeluaran fetus hampir sama. Yang berbeda adalah pada babi, anjing dan kucing. Pada babi sebelum melahirkan akan berputar-putar dalam kandang mencari tempat yang aman, kemudian berbaring. Jika perejanan perut terlihat maka kantong allantois mulai tersembul keluar dari vulva dan pecah disusul penyembulan kantong amnion berwarna putih keabu-abuan, mengkilat dan bertahan lama di vulva dengan perejanan kuat fetus keluar setelah kantong amnion pecah.

2.1.6.3. Stadium pengeluaran plasenta

Beberapa saat sebelum proses kelahiran fetus dimulai, yaitu pada tahap permulaan vili-vili plasenta di beberapa tempat telah mengalami degenerasi. Proses degenerasi berjalan terus sambil uterus berkontraksi selama tahap permulaan. Setelah fetus lahir dan tali pusar putus, volume darah dalam vili-vili turun dengan cepat, dan selanjutnya vili-vili menjadi kempes dan mengkeret. Setelah fetus lahir uterus tetap berkontraksi tetapi tak sekuat saat pengeluaran fetus. Kontraksi uterus yang tak terlalu keras ini masih cukup kuat untuk melePAGkan plasenta fetalis dari endometrium, disamping itu volume uterus berangsur-angsur menjadi kecil. Pengurangan volume dan kontraksi uterus ini menyebabkan kripta-kripta endometrium tempat pertautan vili plasenta menjadi dangkal sehingga mudah terlePAG dan membawa plasenta lebih mendekati servik.

Hormon yang memegang peranan dalam pengeluaran plasenta adalah estrogen dan oksitosin. Keduanya memacu uterus untuk berkontraksi. Oksitosin juga berperan membantu turunnya susu dari alveoli ke dalam saluran susu maka

aktivitas anak yang menyusui juga membawa efek disekresikannya oksitosin yang membantu pengeluaran plasenta..

Pengeluaran plasenta pada kuda, sapi, kerbau, kambing dan domba karena *pengaruh mekanik dan pengaruh hormonal*. Pengaruh mekanik ialah pertama, karena beratnya bagian-bagian plasenta yang menggantung di luar vulva dan kedua, tarikan hewan ketika induk hewan menjilat bahkan menggigit dan menarik serta memakan plasenta tsb. Faktor hormonal ialah pengaruh estrogen dan oksitosin dalam memacu uterus untuk kontraksi dan memperkecil volume uterus sehingga plasenta terdorong ke dalam lumen servik .

Waktu yang diperlukan untuk mengeluarkan plasenta berbeda-beda untuk setiap spesies hewan. Semakin sehat induk hewan semakin pendek waktu yang diperlukan. Pada sapi potong yang mempunyai kesempatan bergerak lebih banyak maka stadium pengeluaran plasenta berlangsung 0,5 – 1 jam. tetapi pada sapi perah yang lebih banyak dikandangkan pengeluaran plasenta berlangsung 1 – 8 jam. Pada domba, kambing dan kuda memakan waktu 0,5 – 3 jam.

Setelah plasenta dikeluarkan, servik mulai mengeluarkan lendir yang banyak mengandung lekosit, bersifat mucous dan berfungsi sebagai sumbat servik untuk mencegah masuknya kuman dari vagina atau vulva ke uterus.

2.1.6.4. Hormon yang berperan dalam proses kelahiran

Oksitosin

Oksitosin dinyatakan sebagai hormon yang memegang peranan penting dalam merangsang uterus untuk memulai berkontraksi. Tetapi pada penelitian

selanjutnya memberikan hasil yang meragukan, pada induk hewan menjelang melahirkan bila dilakukan hipofisektomi yang diharapkan proses kelahiran tidak akan terjadi karena sumber oksitosin tidak ada ternyata tetap terjadi kelahiran normal. Penelitian lain menyebutkan kadar oksitosin sama dengan pada fase kebuntingan muda hanya pada saat tahap perejanan untuk mengeluarkan fetus kadar oksitosin meningkat...Dapat disimpulkan bahwa tahap persiapan bukan disebabkan oleh rangsangan oksitosin melainkan oleh hormon lain yang belum diketahui.

Rangsangan apa yang diterima hipofisis anterior hingga kadar oksitosin meningkat. Dasarnya adalah pada saat fetus meregangkan servik untuk membuka lumennya terjadi rangsangan syaraf yang diteruskan ke otak menuju hipotalamus terutama pada nukleus supraopticus dan paraventricularis untuk memproduksi oksitosin selanjutnya dialirkan ke hipofisis posterior dan keluar melalui peredaran darah menuju urat daging uterus.

Mengapa selama kebuntingan muda kadar oksitosin yang ada tidak menyebabkan uterus berkontraksi. Dalam suatu penelitian dikatakan bahwa peran oksitosin dalam mempengaruhi kontraksi uterus ini dipengaruhi oleh peranan estrogen dan progesteron serta peranan enzim.

Peranan estrogen dan progesteron

Progesteron menghambat daya kerja oksitosin, sedang estrogen membuat uterus menjadi sensitif terhadap rangsangan oksitosin. Saat menjelang kelahiran, persiapan kadar progesteron pada beberapa mamalia menurun sedang kadar estrogen naik. Kedua hormon ini dihasilkan oleh plasenta.

Peranan enzim

Dalam darah primata selama kebuntingan muda didapatkan enzim oksitosinase yang berfungsi meniadakan peranan oksitosin. Pada saat menjelang kelahiran kadar enzim menurun sehingga tidak ada hambatan terhadap oksitosin sehingga terjadi oksitosin pada uterus. Teori ini kurang mendapat dukungan.

Progesteron

Progesteron merupakan hormon yang memegang peranan penting dalam menjaga kebuntingan dengan jalan mencegah terjadinya kontraksi urat daging uterus hingga uterus menjadi tenang. Jika korpus luteum di buang maka kadar progesteron akan hilang dari peredaran darah maka akan terjadi abortus. Pada saat plasenta terbentuk, maka progesteron dan estrogen akan diproduksi oleh plasenta. Perbandingan kadar progesteron dan estrogen secara biologik telah diatur oleh plasenta sedemikian rupa sehingga imbangannya menyebabkan kebuntingan dapat berlangsung baik hingga saat kelahiran. Penurunan kadar progesteron menyebabkan estrogen dominan dalam urat daging uterus serta peningkatan kadar oksitosin dalam merangsang uterus untuk memulai kontraksi.

Estrogen

Sejak plasenta terbentuk estrogen juga mulai terbentuk. Pertambahan estrogen dalam darah ada korelasi positif dengan pertambahan berat plasenta. Semakin berat plasenta semakin tinggi kadar estrogen dalam darah.

Peran estrogen dimulai sebelum terjadi kebuntingan yaitu merangsang kontraksi uterus yang berfungsi membawa semen dari servik ke tempat fertilisasi, pada saat terjadi kebuntingan, estrogen merangsang uterus untuk berkontraksi baik sendiri maupun bersama-sama oksitosin, tetapi estrogen hanya mampu merangsang kontraksi uterus sampai tingkat kontraksi lemah tidak sampai terjadi kontraksi tonus. Sedangkan oksitosin dapat merangsang uterus untuk berkontraksi secara kuat.

Peran Prostaglandin dan Hormon Lokal

Liggin dkk. (1972) yang didukung oleh Thornburn dkk.(1972) mengembangkan teori peranan hormon yang beredar dalam tubuh fetus yang telah mencapai umur tertentu dalam kandungan dan peristiwa dimulainya kontraksi urat daging uterus untuk memulai proses kelahiran. Percobaannya menggunakan domba, dibuktikan bahwa ACTH yang dihasilkan oleh hipofisa anterior fetus merangsang kelenjar adrenal , selanjutnya dari kelenjar adrenal akan dihasilkan glucocorticoid dan steroid (C19). Steroid ini melalui aliran darah menuju plasenta induk dan merangsang plasenta untuk menghasilkan prostaglandin F2 alfa (PGF2 alfa) dan menaikkan kadar estrogensedangkan produksi progesteron menurun. PGF2 alfa akan merangsang kontraksi urat daging uterus, semakin tinggi kadar PGF2 alfa semakin kuat kontraksi uterus. Mc Cracken dkk. (1972) membuktikan bahwa PGF2 alfa yang dihasilkan uterus selain mengalir ke jantung melalui vena, juga ada yang melintas ke arteri ovarica dan mempengaruhi korpus luteum, sehingga korpus luteum berdegenerasi dan produksi progesteron menurun.

2.2. *Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG)*

Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) merupakan antigen khusus yang dapat ditemukan di dalam darah sapi bunting mulai umur kebuntingan 7 hari (Clarke *et al.*, 1978). Keberadaan PAG ini merupakan suatu respon imun sebagai akibat adanya kebuntingan (Barnea *et al.*, 2000; Howard, 1998; Transom, 2001). Berat molekul *Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG)* pada sapi berkisar 65-67 kD.

Pregnancy-Associated Glycoprotein dan dapat dideteksi pada 6-24 jam setelah fertilisasi pada semua spesies seperti mencit, manusia, babi dan domba (Cavanagh, 1996; DuPlants, 2000). PAG ditemukan setelah proses implantasi dan tetap berada di dalam darah induk sampai akhir kebuntingan dan menghilang sebelum partus (DuPlants, 2000). Sedangkan El Amiri *et al.* (2000) mengemukakan bahwa pada lapisan superficial dari tropoderm ruminansia memproduksi *Pregnancy associated glycoproteins (PAGs)* yang merupakan suatu protein tanpa aktivitas hormonal dan keberadaanya dikaitkan dengan adanya kebuntingan dini.

Antisera terhadap PAG yang dibuat pada kelinci dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan embrio mencit (DuPlants, 2000) dengan jalan menghambat proses implantasi (Barnea *et al.*, 2000) dan dapat digunakan untuk tes diagnostik kebuntingan (Hafez, 2000; Knobil *et al.*, 1988; Likes *et al.*, 2002)).

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah :

- Mengidentifikasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) yang merupakan protein awal kebuntingan dari air susu sapi perah bunting.
- Melakukan isolasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dari air susu sapi perah bunting.

3.2. Manfaat Penelitian

- Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji penggunaan *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dari air susu sapi bunting. sebagai bahan diagnosa kebuntingan dini pada sapi secara laboratoris.
 - Peternak sapi, dapat digunakan tes ini untuk mendeteksi kebuntingan dini pada sapi sehingga dapat mengukur tingkat reproduktifitasnya.
 - Sebagai model untuk mengkaji PAG dari ternak ruminansia lain sebagai bahan diagnostik tes kebuntingan dini.

BAB IV

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di UPT Sapi Perah Branggahan Kediri dan Laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair, penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai dengan Oktober 2010.

4.2. Hewan Coba, Bahan dan Alat Penelitian

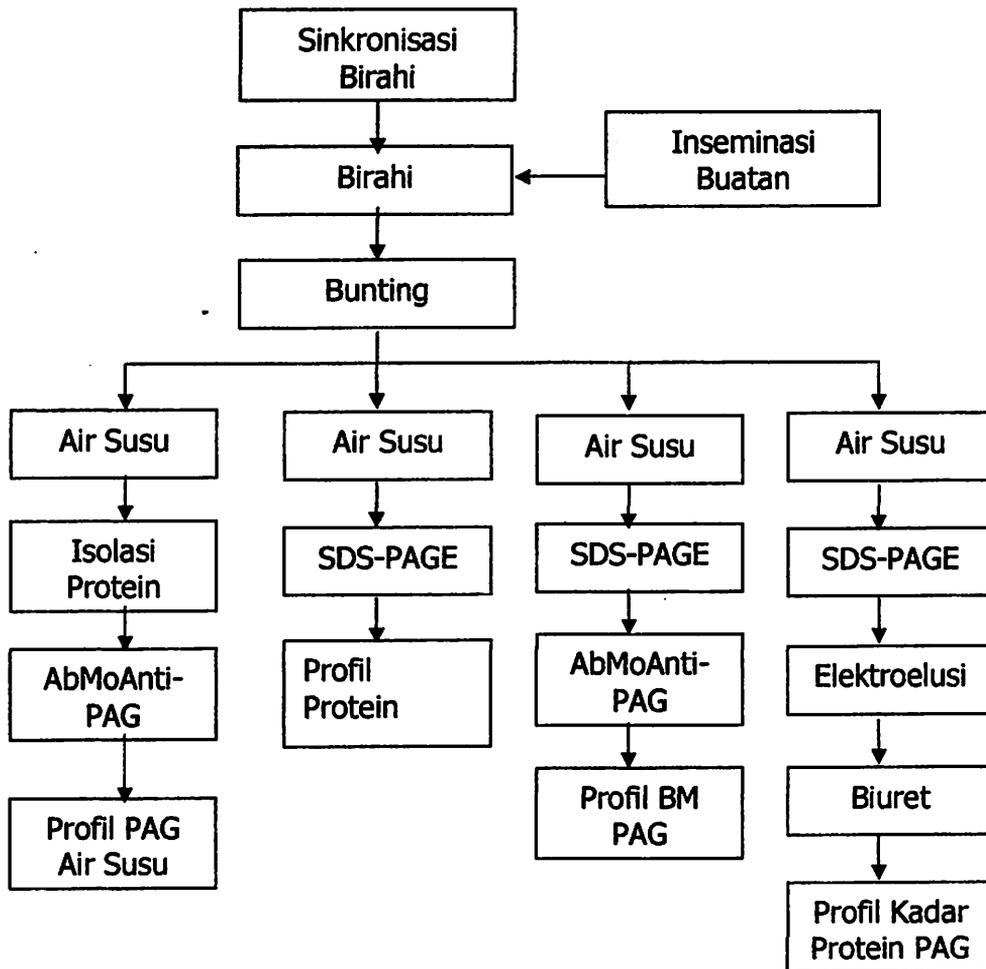
Pada penelitian ini digunakan 10 ekor sapi perah umur 2-3 tahun dengan siklus birahi normal dari UPT Sapi Perah Branggahan Kediri dan bahan penelitian yang digunakan berupa air susu sapi perah bunting 3-4 bulan.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Na-citrat (Sigma, S-4541), Deionized water (nanopore), Tween-20 (Biorad, 170-6531), Phosfat buffer salin-tween (PBS-T, pH 7.4), Bufer carbonat-bicarbonat, NaCl (Sigma, S-7653), Asam sitrat (Sigma, C-0909), Penisillin (Meiji), Streptomisin (Meiji), Sodium azide (Sigma, S-8032), Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit (Pierce, 23260), Glycoprotein Staining Kit (Pierce, 24562), Ammonium sulfat (Sigma, A-2939), amonium persulfat (APS, Biorad, 161-0700), Casein (Sigma C-5890), Bovine Serum Albumin (BSA, B 4287), Bufer tris-glisin, Bufer fosfat, bis-acrilamid (plus one, 17-13041), Poliakrilamid (Promega, V311A), Sodium Deodocyl Sulfonat (SDS, Biorad, 161-0301), TEMED (Sigma), Mercaptoethanol (Biorad, 161-0710), Commasie Brilliant Blue R250 (Sigma C-7920), Bromophenol blue (Merck, 8122-0025), Marker protein (Biorad), Ethanol (Merck), Methanol (Merck).

4.3. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler FKH Unair dengan tahapan-tahapan metode sebagai berikut : karakterisasi PAG dari sapi bunting melalui teknik karakterisasi protein PAG air susu dengan *Sodium Dodesil Sulfat Poliakrilamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) , uji spesifikasi protein PAG dari air susu dengan metode *Western Blot* dan isolasi protein PAG dengan metode elektroelusi.

Prosedur penelitian dapat dibagangkan sebagai berikut :



Gambar 3.1. Bagan Rancangan Penelitian karakterisasi *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) dari air susu sapi perah bunting

4.3.1. Sinkronisasi birahi dan Inseminasi Buatan pada Sapi Perah

Sinkronisasi birahi dilakukan pada 20 ekor sapi perah dengan menggunakan hormon PGF2 α secara intra vulva dengan dosis 7,5 mg per ekor. Pengamatan birahi dilakukan dengan melihat gejala birahi yang timbul yaitu vulva merah, bengkak, basah dan lendir serviks. Inseminasi buatan dilakukan dengan menggunakan semen beku setelah 9-24 jam tanda birahi tampak.

4.3.2. Isolasi Protein Air Susu

Pengambilan air susu dilakukan pada sapi perah yang telah dipastikan bunting 2-5 bulan dengan menggunakan palpasi rektal. Air susu yang telah diperoleh dipisahkan proteinnya dari bahan lain. Air susu ditambah dengan PBST SPMF sebanyak lima kali volume air susu dan disonikasi selama 10 menit. Kemudian disentrifus 6000 rpm selama 15 menit. Endapan yang terjadi dibuang dan supernatannya disonikasi selama 10 menit, setelah itu disentrifus 10000 rpm selama 15 menit. Supernatan ditambah dengan etanol absolut 1 : 1 dan dibiarkan sampai terbentuk endapan. Setelah terbentuk endapan, dikeringanginkan dan hasilnya ditambahkan buffer sesuai dengan pH yang diinginkan.

3.3.3. Metode Identifikasi Protein Cotyledon dengan SDS-PAGE

Persiapan gel, *plate gel* dibuat dengan merangkai dua *plate* kaca dengan jarak antar plat \pm 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfate* (APS) dan *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamina (TEMED), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat elektroferesis set mini protein gel dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi sampel, sampel yang berisi 12,5 μ l sampel sel air susu dan 12,5 μ l *running sample buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 μ l untuk tiap sumur. Protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik dengan arus listrik sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda \pm 0,5 cm dari batas bawah *plate gel*.

Perlakuan setelah *running*, gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 ml asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan massa molekul relative protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Penentuan berat molekul glikoprotein dilakukan dengan menghitung

Retardation Factor (Rf) dari masing-masing pita dengan menggunakan rumus (Sumitro, 1996) sebagai berikut :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relative sampel. Nilai Rf dan berat molekul protein standar sebagai berikut :

Tabel 3.1. Nilai Protein Standar Produksi Biorad

Rf (Sb X)	BM (kDa)
0,064	200
0,177	116,25
0,223	97,4
0,371	66,2
0,564	45
0,887	31

4.3.4. Metode Isolasi Protein PAG dengan Elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selovan dan direndam dengan 0,05 M *phospate buffer* (PB) sebanyak 1-2 ml. Kemudian dimasukkan dalam *chamber* elektroelusi yang mengandung *phospate buffer* 0,01 M. Selanjutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 40 0C (dalam

refrigerator), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama semalam.

Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara melakukan potongan *gel acrilamide* dan diwarnai dengan *staining commasie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan *destaining*, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selovan dikeluarkan, kemudian dipresipitasikan dan dipurifikasi untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

4.3.5. Uji Spesifisitas Protein PAG dengan *Western Blot*

Western blot dilakukan dengan menggunakan fragmen pita PAG sapi yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dan ditransfer pada membran *Nitroselulose*. Membran diblok dengan 3 % BSA dalam 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama satu jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung 1 % BSA dengan antibody monoclonal anti-PAG sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05 % Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti-rabbit IgG label AP, pengenceran 1 : 1000) dan ditambahkan substrat *western blue*. Pita yang muncul adalah pita PAG sehingga bisa diketahui BM isolat PAG.

4.3.6. Metode Pemeriksaan Isolat Protein PAG dengan Biuret

4.3.6.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA 5000 ppm

Sebanyak 200 μ l larutan standar Bovine Serum Albumine (BSA) konsentrasi 5000 ppm dimasukkan ke dalam eppendorf, ditambah dengan 800 μ l reagen Biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran panjang gelombang 500-600 nm. Sebagai blanko, dipipet 200 μ l aquades dan 800 μ l reagen Biuret.

4.3.6.2. Pembuatan Kurva Standar BSA

Disiapkan 10 eppendorf, masing-masing ditambah dengan 200 μ l larutan standar BSA dengan variasi konsentrasi 1000-10000 ppm. Masing-masing ditambah dengan 800 μ l reagen Biuret. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Kemudian dibuat persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh kurva standar BSA.

4.3.6.3. Pengukuran Kadar Protein PAG

Diambil 200 μ l sampel PAG, ditambah 800 μ l reagen Biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Sebagai blanko

dipipet 200 μ l air dan ditambah 800 μ l reagen Biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali.

Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data dan absorbansi ke kadar melalui persamaan regresi linear kurva standar BSA dengan menggunakan rumus (Hamilton, 1992) :

$$Y = a + bX, \text{ dimana } X : \text{konsentrasi total protein } (\mu\text{g/ml})$$

4.6. Analisis Data

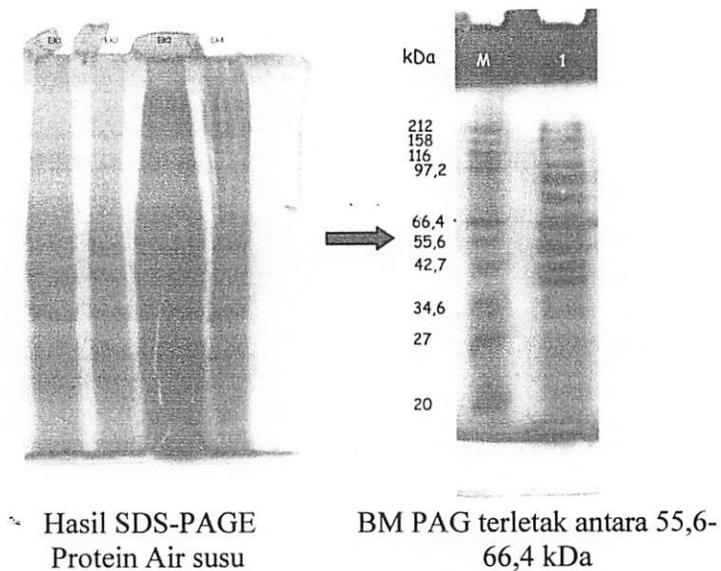
Data berupa berat molekul dan kadar PAG air susu ditabulasikan dan disajikan dalam bentuk diskriptif. Keberhasilan anti-PAG sebagai bahan bioaktif untuk diagnosis kebuntingan sapi perah diuji dengan uji validitas (sensitivitas dan spesifisitas).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Identifikasi Protein *Cotyledon* dengan SDS-PAGE

Hasil SDS-PAGE dari air susu sapi perah bunting dapat dilihat pada gambar dibawah ini :



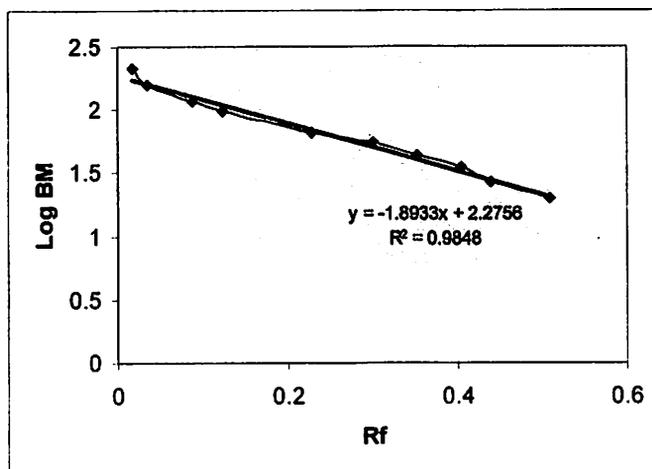
Gambar 5.1. Pita-pita protein air susu sapi perah bunting

Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Berat molekul isolat PAG ditentukan dengan mengplotkan harga Rf yang diperoleh pada persamaan regresi linier $Y = -1.8933X + 2.2756$ (lampiran 1).

Mercuraptoethanol digunakan untuk merusak ikatan disulfida dan memecah protein. SDS digunakan untuk mengisi protein secara natural, sehingga semua

protein mempunyai isi sama dengan rasio massa (SDS per 1,4 asam amino). Bila protein tersebut ditransfer ke dalam gel dan dengan menggunakan listrik, protein bermigrasi menembus lubang gel *polyacrylamide*, gel memisahkan protein berdasar ukuran molekul. Protein dengan molekul kecil akan bergerak lebih cepat ke bawah, sedangkan molekul besar bergerak lebih lambat. Pada elektroforegram hasil SDS-PAGE nampak pita protein dengan berat molekul paling kecil berada paling bawah sedangkan protein dengan berat molekul paling besar berada paling atas.

Molekul protein yang terdeteksi pada membran nitroselulose hasil SDS-PAGE masih belum spesifik. Agar diperoleh protein spesifik perlu dilakukan tahapan penelitian selanjutnya yaitu dengan metode *Western Blot*. Kurva hubungan antara Rf (X) dengan log BM protein standar (Y) dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2. Kurva hubungan antara Rf dengan log BM protein standar

Pita protein yang diidentifikasi dari protein air susu dapat dilihat pada tabel

5.1. di bawah ini :

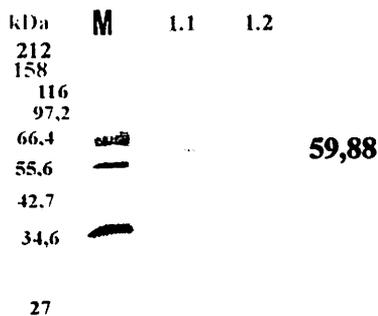
Tabel 5.1. Berat molekul pita-pita protein air susu sapi perah bunting

Rf (X)	LogBM(Y)	BM kDa
0.0526	2.176012	149.97
0.0702	2.14269	138.89
0.0877	2.109558	128.69
0.1404	2.009781	102.28
0.2632	1.777283	59.88
0.2982	1.711018	51.41
0.3684	1.578108	37.85
0.5439	1.245834	17.61
0.5789	1.179569	15.12

Pita-pita protein PAG air susu sapi perah bunting yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE setelah dibandingkan dengan protein marker terletak diantara BM 55,6-66,4 kDa. Pita-pita protein tersebut sesuai dengan berat molekul PAG atau *Pregnancy Associated Glycoprotein* (PAG) yang ditemukan oleh Heyman *et al.* (2004) dan Roover *et al.* (2002) berkisar 55-67 kDa. Sedangkan Sousa *et al.* (2002) menemukan berat molekul PAG sapi Zebu (*Bos indicus*) antara 51-69 kDa. Demikian juga hasil penelitian Karen *et al.* (2003) dan Garbayo *et al.* (1998) melaporkan penemuannya bahwa BM PAG sapi ada tiga yaitu 55 kDa, 59 kDa dan 67 kDa. El Amiri *et al.* (2004) melakukan analisis imunoreaktif dengan SDS-PAGE dan menemukan BM dari PAG sapi berkisar 55-66 kDa. Pita-pita protein dengan berat molekul tersebut dielektroelusi supaya terpisah dengan protein lain dan selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar protein tersebut dengan metode biuret.

5.2. Uji Spesifisitas Protein PAG dengan *Western Blot*

Untuk mengetahui bahwa molekul PAG yang mempunyai berat molekul antara 55-67 kDa bereaksi spesifik dengan antibodi hasil induksinya dilakukan dengan metode *Western Blot*. Hasil *Western Blot* dapat dilihat pada gambar 4.5., yang menunjukkan bahwa isolat PAG dapat dikenali oleh anti-PAG dengan BM 59,88 kDa.



Gambar 5.3. Hasil *Western Blot* isolat PAG dengan BM 59,88 kDa

Western blot bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks protein-antibodi-antibodi *sandwich*. Antibodi sekunder berikatan dengan enzim *horse radish peroxydase* yang dapat merubah substrat luminal menjadi substansi berwarna terang. Substansi ini dapat diukur kadar protein dan ukuran molekul relatif dengan dibandingkan protein marker.

Hasil *western blot* ini mengindikasikan bahwa molekul PAG berikatan secara spesifik dengan antibodi PAG sebagai antibodi primer dan anti *rabbit* IgG sebagai antibodi sekunder. Antibodi PAG dan anti *rabbit* IgG dapat mengenali

protein PAG sebagai pita dengan berat molekul 59,88 kDa. Karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul PAG dengan BM sebesar 59,88 kDa.

Pengenalan Protein spesifik PAG oleh antibodi PAG melibatkan ikatan nonkovalen dan reversibel. Kekuatan ikatan antara protein PAG dengan antibodi tergantung faktor elektrostatis, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan jumlah epitop (Baratawidjaja, 2004).

Protein PAG dengan berat molekul 59,88 kDa termasuk dalam antigen poten yang mampu menginduksi respon imun. Protein makromolekul dapat bersifat multideterminan, univalen dengan mempunyai banyak epitop tetapi hanya satu dari setiap macamnya. Jumlah epitop ini menentukan kekuatan afinitas dan aviditas dari antibodi (Baratawidjaya, 2004). Seperti halnya dengan protein PAG yang merupakan protein makromolekul mempunyai epitop multideterminan univalen. Karena itu ikatan protein PAG dengan antibodi PAG menghasilkan afinitas dan aviditas tinggi sehingga terbentuk ikatan yang kuat dan bersifat stabil.

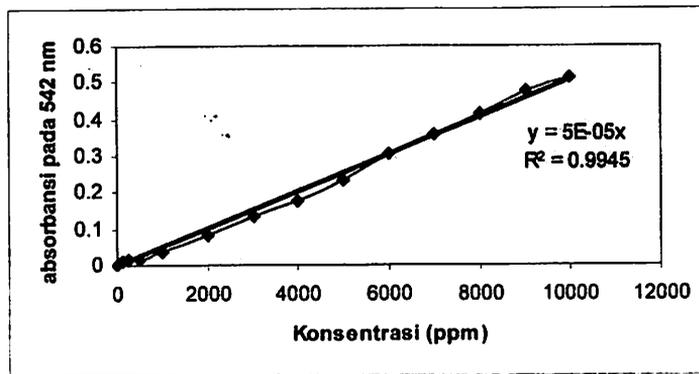
5.3. Pengukuran Kadar Protein Isolat PAG

Setelah dipastikan bahwa protein yang akan dipotong (elusi) adalah PAG melalui uji Western Blot, maka hasil elusi diperiksa dengan biuret menentukan kadar protein PAG. Penentuan kadar protein dilakukan dengan bantuan protein standar seperti terlihat pada tabel 2.2.

Tabel 5.2. Absorbansi Bovin Serum Albumin (BSA) pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

Konsentrasi (X)	Abs 1	Abs 2	Abs rata-rata (Y)
0	0	0	0
25	0.002	0.005	0.0035
125	0.011	0.007	0.009
250	0.013	0.014	0.0135
500	0.015	0.019	0.017
1000	0.034	0.038	0.036
2000	0.081	0.082	0.0815
3000	0.133	0.136	0.1345
4000	0.174	0.175	0.1745
5000	0.239	0.229	0.234
6000	0.309	0.301	0.305
7000	0.358	0.358	0.358
8000	0.409	0.418	0.4135
9000	0.473	0.478	0.4755
10000	0.514	0.512	0.513

Kadar protein diperoleh dengan mengplotkan harga absorbansi ke dalam persamaan linier $Y = 5E-05X$ (gambar 5.4).



Gambar 5.4. Kurva absorbansi Bovin Serum Albumin pada $\lambda = 540 \text{ nm}$

Kadar protein PAG air susu sapi perah bunting adalah sebagai berikut :

Tabel 5.3. Kadar protein PAG air susu sapi perah bunting

Sampel	Abs1	Abs2	Rata-Rata Abs	Kadar Protein ($\mu\text{g/ml}$)
Air susu	0,320	0,328	0,324	6480

Daftar Pustaka

- Austyn J.M. and K.J. Wood. 1993. Principles of Cellular and Molecular Immunology. 1st Ed. Oxford University Press. Pp. 695
- Barnea, E.R. 2000. Early Pregnancy: Biology and Medicine. Early Pregnancy Volume IV. pp. 166-175
- Cavanagh, A.C. 1996. Identification of Early Pregnancy Factor as Chaperonin 10: Implications for Understanding Its Role. *J. Reprod. Fert.* 1: 28-32
- Clarke, F.M., H. Morton and G.J.A. Clunie. 1978. Detection and Separation of Two Serum Factors Responsible for Depression of Lymphocyte Activity in Pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.* 32:318-323
- Clarke, F.M., H. Morton, B.E. Ralfe and G.J.A. Clunie. 1980. Partial Characterization of Early Pregnancy Factor in The Sheep. *J. Reprod. Immunol.* 2:151-162
- Clarke, F.M and S. Wilson. 1982. Biochemistry of Early Pregnancy Factor. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinkas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 407-412
- Cruz, Y.P., L. Selwood, H. Morton and A.C. Cavanagh. 2001. Significance of Serum Early Pregnancy Factor Concentrations During Pregnancy and Embryonic Developmeent in Sminthopsis Macroura (Spencer)(Marsupialia: Dasyuridae). *J. Reprod. Fert.* 121: 933-939
- Darnell J., H. Lodish and D. Baltimore. 1990. *Moleculer Cell Biology*. 2nd Ed. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York. Pp. 711-716
- Direktur Jendral Peternakan. 2006. Produksi Daging, Telur dan Susu. http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm
- DuPlants, L.J. 2000. Early Pregnancy Factor. *Lifeissues.net*. Kochi, Japan. All Rights Reserved. pp. 1-2
- El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-Mboko and J.F. Beckers. 2000. Pregnancy-Associated Glycoprotein In Bos Taurus and Bos Taurus Indicus. *Theriogenology* 53:283
- El Amiri B, B Remy, NM De Sousa and JF Beckers. 2004. Isolation and characterization of eight pregnancy-associated glycoproteins present at high level ovine placenta between day 60 and day 100 of gestation. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:169-181
- Garbayo JM, B Remy, JL Alabart, J Folch, R Wattiez, P Falmagne and JF Beckers. 1998. Isolation and partial characterization of a pregnancy-associated glycoprotein family from the goat placenta. *Biology of Reproduction* 58:109-115
- Garbayo JM, JA Green, M Manikkam, JF Beckers, DO Kiesling, AD Early and RM Roberts. 2000. Genetics, gene regulation and expression. *Molecular Reproduction and Development* 57:311-322
- Gonzales F., J Sulon, JM Garbbayo, M Batista, F Cabrera, Po Calero, A Gracia and JF Backers. 2000. Secretary Profiles of Pregnancy-Associated

- Glycoproteins at Different Stages of Pregnancy in the Goat. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol. 35 : 79
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Heyman, Y., P. Chavatte, N. Melo de Sousa, F. Constant, M. Guillomot, X. Vignon and J.F. Beckers. 2004. 37 Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) Profiles During The Peri-Implantation Period in Recipients Carrying Bovine Somatic Clones : Preliminary Results. *Reprod, Fertility and Development* 17 (2) 168-169.
- Howard, P.J. 1998. Morning After Pills: How Do They Prevent Pregnancy ?. *Lancet* 352: 422-428.
- Hunter, R.P.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung, Penerbit Universitas Udayana. Hal. 353-357.
- Karen A, P Kovacs, JF Beckers and O Szenci. 2003. Review article pregnancy diagnosis in sheep: review of the most practical methods. *Acta Vet. BRNO* 70:115-126
- Likes, R.L. 2002. *Pregnancy Diagnosis*. Department of Emergency Medicine, Darnall Army Community Hospital. pp. 1-9
- Morton, H., B. Ralfe and A. Cavanagh. 1982. Early Pregnancy Factor, Biology and Clinical Significance. In: *Pregnancy Proteins*, Edited by J.G. Greedzinkas, B. Teisner and M. Seppala. Academic Press, New York. pp. 391-405
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ke Tiga. Mutiara Sumber Widya Jakarta.
- Perenyi, Zs., H. Desbuleux, J. Sulon, H. Bangamboko, N.M. Sousa, B. El Amiri, O. Szenci and J.F. Beckers. 2002. Pregnancy Associated Glycoprotein Profiles of 5 Heifers Measured By Three Radioimmunoassay Systems. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 6(1), 5-6.
- Robert, K and A. Peter. 1993. *Harper's Biochemistry*. 23rd edition. Preble Hall International Inc. USA
- Sousa, N.M., B. Remy, B. El Amiri, J.R. de Figueiredo, H. Bangamboko, P.B.D. Goncalves and J.F. Beckers. 2002. Characterization of Pregnancy Associated Glycoprotein Extracted from Zebu (*Bos indicus*) Placental Removed at Different Gestational Periods. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 227-241.
- Sudardjad S. 2005. *Operasional Program Terobosan Menuju Kecukupan Daging Sapi 2005*. Direktorat Jendral Bina Produksi Peternakan.
- Steel, R.G.D and Trrie. 1995. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Penerbit P.T. Gramedia Pustaka Utama Jakarta. Hal. 168-181.
- Toelihere, M.R. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa Bandung.
- Transom, G. 2001. Early Pregnancy Factor (EPF)-Background and Prospects. *Research Report*, Cbio Limited. pp. 1-9
- Vandaele L, S Verberckmoes, S De Cat, B El Amiri, J Sulon, L Duchateau, A Van Soom and JF Beckers. 2004. 141 effect of number of lambs, their sex and

- birth weight on ovine pregnancy-associated glycoprotein (ov PAG) concentrations. *Reproduction, Fertility and Development* 16(2): 192-193
- Wide L. 1962. An Immunological Method for the Assay of Human Chorionic Gonadotrophin. *Acta Endocrinologica. Supplement 70. Periodica. Copenhagen.*
- Wilson, S., R. McCarthy and F.M. Clarke. 1983. In Search of Early Pregnancy Factors. Isolation of Active Polypeptides from Pregnant Ewe's Sera. *J. Reprod. Immunol.* 5:275—286
- Xie SC, BG Low, RJ Nagel, KK Kramer, RV Anthony, AP Zoli, JF Beckers and RM Roberts. 1991. Identification on the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22): 10247-10251