

Kadar Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) Air Susu Sapi Perah Hari Ke 21 dan 28 Pasca Inseminasi Buatan**Concentration Of Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG) Of Milk Of Dairy Cows At 21 and 28 Days Post Artificial Insemination****Abdul Samik**

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785, Fax. 031-5993015

Email : samik_s3@yahoo.co.id

Abstract

The development of early pregnancy diagnosis method in dairy cows can be undertaken by observing specific substance presents in the milk of pregnant cows, i.e. the Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG). The objective of this study was to prove that anti-PAG was able to recognize PAG protein from milk of pregnant dairy cow as the base for developing one of early pregnancy test in dairy cows. This study was conducted by following stages: 1) synchronization of estrus and artificial insemination and 2) identification of PAG protein in the milk at 21 and 28 days post AI. The result showed that average of concentration of PAG protein in the milk at 21 days post AI are 370,221 µg/ml and 716,317 µg/ml. Based on the results, it can be concluded that dairy cows pregnancy diagnosis with identification of PAG protein at 28 day after AI has more reliable validation value as compared at 21 day after AI.

Keywords : estrus synchronization, artificial insemination, PAG of milk, pregnancy diagnosis**Pendahuluan**

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).

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 (Vandaele *et al.*, 2005) belum dapat dilaksanakan secara cepat dilapangan karena beberapa faktor seperti sulitnya pelaksanaan, mahalnya harga kit dan sulitnya mendapatkan bahan-bahan untuk keperluan RIA.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di BPT HMT sapi perah Branggahan Kediri dan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Unair. Penelitian dilakukan pada bulan April sampai Juli 2011 dengan menggunakan 25 ekor sapi perah yang telah beranak lebih dari satu kali.

Sinkronisasi Birahi

Sebanyak 25 ekor sapi perah tidak bunting dan siklus birahi normal yang telah beranak lebih dari satu dilakukan sinkronisasi birahi dengan menggunakan hormon prostaglandin (Capriglandin, Sanbe) pola penyuntikan dua kali dengan interval penyuntikan 11 hari. Dosis yang digunakan adalah sebesar 7,5 mg/ekor secara intra vulva.

Inseminasi Buatan

Inseminasi buatan dilakukan 12-18 jam setelah sapi menunjukkan gejala birahi. Frozen semen yang digunakan berasal dari BBIB Singosari.

Pengukuran Kadar PAG Air Susu Pasca Inseminasi Buatan

Air Susu diambil dari 25 ekor sapi perah pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan dan ditampung dalam tabung reaksi dan ditutup. Tabung dimiringkan 45° dan didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Kemudian disimpan dalam freezer dengan suhu - 20 °C sampai digunakan untuk uji selanjutnya. Pembacaan PAG air susu dilakukan dengan metode Sandwich ELISA.

Sandwich ELISA dilakukan dengan tahapan sebagai berikut : *Microplate* 96 well dilapisi dengan antibodi PAG sebanyak 100 µl, kemudian diinkubasi pada 4 °C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan di blok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1 %, kemudian dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan PAG (air susu dari sapi perah yang diduga bunting) sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi *conjugate alkaline*

phosphatase dan diinkubasi pada 37 °C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil OD dibaca pada ELISA *reader* sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm dan dikonversikan dengan kurva standar protein PAG.

Hasil dan Pembahasan

Sebanyak 50 ekor sapi perah disinkronisasi birahi dengan menggunakan kombinasi hormon PGF₂α (Capriglandin, Sanbe) secara intra vulva dengan dosis 7,5 mg/ekor. Sebelum sinkronisasi birahi dilaksanakan, terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan kebuntingan sapi perah untuk mempertegas bahwa sapi perah yang disinkronisasi birahi tidak bunting. Injeksi 7,5 mg PGF₂α dilakukan dengan dua kali dengan selang waktu 11 hari (Whitley and Jackson, 2004). Birahi timbul 3 hari penyuntikan PGF₂α. kedua. Perkawinan dilakukan secara inseminasi buatan dengan menggunakan *frozen* semen setelah 12-18 jam dari awal tanda birahi.

Tabel 1. Kadar Protein PAG Air Susu Sapi Perah

Nomer Sapi Perah	Protein PAG (µg/ml)		Nomer Sapi Perah	Protein PAG (µg/ml)	
	21 hari Pasca IB	28 hari Pasca IB		21 hari Pasca IB	28 hari Pasca IB
1	-	370.375	26	95.375	340.375
2	-	350.375	27	102.875	410.375
3	-	-	28	107.875	557.875
4	-	-	29	-	-
5	-	340.375	30	-	330.375
6	140.375	377.875	31	-	-
7	147.875	387.875	32	-	-
8	137.875	400.375	33	122.875	337.875
9	120.375	372.875	34	-	327.875
10	-	-	35	-	322.875
11	-	-	36	-	-
12	-	-	37	-	365.375
13	-	447.875	38	-	445.375
14	-	477.875	39	-	345.375
15	-	-	40	-	322.875
16	-	-	41	-	-
17	117.875	320.375	42	-	330.375
18	127.875	385.375	43	-	320.375
19	137.875	507.875	44	-	360.375
20	-	420.375	45	-	387.875
21	-	347.875	46	-	365.375
22	-	400.375	47	-	377.875
23	-	-	48	-	342.875
24	-	-	49	105.375	362.875
25	97.875	327.875	50	100.375	332.875

Pengukuran kadar PAG air susu menggunakan metode mikrotiter strip dilakukan pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan. Nilai absorbansi dari pemeriksaan mikrotiter strip dikonversikan dengan persamaan regresi linier kurva standar PAG dengan persamaan $Y = 0,008X + 1,437$. Hasil PAG mikrotiter strip didasarkan reaksi ikatan antibodi PAG dan protein PAG serum darah sapi perah melalui *Sandwich* ELISA dengan hasil seperti pada tabel 1.

Pada hari ke 21 dan 28 hari pasca inseminasi buatan diperoleh hasil mikrotiter strip positif masing-masing 14 ekor dan 36 ekor. Rataan kadar protein PAG air susu sapi perah yang diperoleh pada hari ke 21 dan 28 pasca inseminasi buatan adalah 370,221 µg/ml dan 716,317 µg/ml.

Xie *et al.* (1996) dan El Amiri *et al.* (2003) mendeteksi PAG pada induk sapi perah sejak umur kebuntingan tiga minggu. Konsentrasi PAG dilaporkan mencapai optimal sebelum proses kelahiran. Gonzales *et al.* (2000) menemukan bahwa konsentrasi PAG sapi perah mencapai maksimal pada usia kebuntingan 8 minggu dan mulai menurun pada minggu ke 12-14 yang selanjutnya konstan sampai partus. Substansi PAG terdeteksi pada umur kebuntingan tiga sampai empat minggu, konsentrasi PAG ini berbanding lurus dengan *breed*, jumlah fetus, dan berat fetus sedangkan umur induk dan jenis kelamin fetus tidak berpengaruh terhadap kandungan PAG dan mulai menurun drastis setelah empat minggu post partum (El Amiri *et al.*, 2000).

Diagnosis kebuntingan secara dini sangat bermanfaat digunakan sebagai alat untuk mengelola ternak lebih lanjut. Ternak yang tidak bunting dipisahkan dengan yang bunting lebih awal untuk mendapatkan perlakuan sesuai dengan status fisiologisnya. Ternak yang bunting diberi makanan sesuai dengan kebutuhan perkembangan fetus yang ada dalam kandungan, sedangkan ternak yang tidak bunting segera dievaluasi status kesehatan reproduksinya. Bila ternak masih memungkinkan untuk diperbaiki status reproduksinya maka perlu penanganan khusus agar secepatnya bisa bunting kembali. Namun bila hasil evaluasi tidak memungkinkan untuk dipelihara lebih lanjut maka ternak bisa digemukkan untuk diambil dagingnya atau langsung di potong (Hunter, 1995).

Diagnosis kebuntingan lebih awal pada ternak khususnya ternak penghasil susu akan bermanfaat secara ekonomis karena apabila ternak tidak bunting maka akan mempengaruhi kelangsungan dan jumlah produksi susu. Jarak antar beranak yang panjang sangat tidak efisien

karena akan menurunkan efisiensi reproduksi dalam hal menghasilkan keturunan yang secara tidak langsung akan menghambat perkembangan populasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan bahwa untuk diagnosis kebuntingan dengan mengukur kadar protein PAG air susu bisa dilakukan pada hari ke 28 pasca inseminasi dengan keakuratan yang tinggi (76 %).

Ucapan Terima Kasih

Diucapkan terimakasih kepada Rektor Unair yang telah memberikan kesempatan dan membiayai penelitian ini melalui dana DIPA UNAIR No: 844/H3/KR/2011 tanggal 10 April 2011.

Daftar Pustaka

- El Amiri, B., N.M. Sousa, Zs. Perenyi, H. Banga-Mboko and J.F. Beckers. 2000. Pregnancy-Associated Glycoproteins In Bos Taurus and Bos Taurus Indicus. *Theriogenology* 53:283
- El Amiri B., B. Remy, N.M. De Sousa and J.F. Beckers. 2003. Isolation and Characterization of Eight Pregnancy-Associated Glycoprotein Present at High Levels in the Cattle Placenta between Day 60 and Day 100 of Gestation. *Reprod Nutr Dev.* 44(3): 169-181
- Gonzales F., J. Sulon, J.M. Garbayo, M. Batista, F. Cabrera, P.O. Calero, A. Gracia and J.F. Beckers. 2000. Secretory Profiles of Pregnancy-Associated Glycoproteins at Different Stages of Pregnancy in the Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. Vol 35. p 79.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th Ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. p. 395-404.
- Hunter, R.P.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung, Penerbit Universitas Udayana. Hal. 353-357.
- Vandaele L., S. Verberckmoes, B. El Amiri, J. Sulon, L. Duchateau, A. Van Soom, J.F. Beckers and A. de Kruif. 2005. Use of a Homologous Radioimmunoassay (RIA) to Evaluate the Effect of Maternal and Foetal Parameters on Pregnancy-Associated Glycoprotein (PAG) Concen-

- tration in Cattle. *Theriogenology*. 63(7): 1914-1924
- Xie S., R.J. Nagel, J. Green, J.F. Beckers and R.M. Roberts. 1996. Trophoblast Specific Processing and Phosphorylation of Pregnancy-Associated Glycoprotein-1 in Day 15 to 25 Cattle Placenta. *Biol Reprod*. 54(1): 122-129