

LAPORAN  
HASIL PENELITIAN HIBAH BERSAING  
TAHUN ANGGARAN 2011

TAHUN KE II



**Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)*  
Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro*  
Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel  
Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium**

Peneliti :

Dr.HERRY AGOES HERMADI, MSi., drh.  
Prof.Dr. WURLINA, MS., drh.  
Prof. MAS'UD HARIADI, MPhil., drh., PhD.

Dibiayai oleh DIPA Universitas Airlangga sesuai dengan Surat  
Keputusan Rektor Tentang Kegiatan Penelitian Multi Tahun, Pengabdian  
Kepada Masyarakat Mono Tahun dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Multi Tahun Universitas Airlangga Tahun Anggaran 2011 No.  
844/H3/KR/2011 Tanggal 20 April 2011

UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN 2011

**Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovari.**

**Ketua Peneliti**

Nama : Dr Herry Agoes Hermadi, MSi, drh  
 Jenis Kelamin : Laki-laki  
 Pangkat/Golongan : Lektor Kepala/ IVB  
 N I P : NIP.195908231987031003  
 Jabatan Fungsional : Lektor Kepala  
 Fakultas/Jurusan/Puslit : Kedokteran Hewan/Reproduksi dan Kebidanan  
 Bidang Keahlian : Biologi reproduksi - Infertility  
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
 Jangka Waktu Penelitian : 2 tahun (tahun 2010-2011)

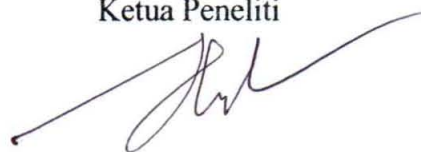
**Tim Peneliti**

No.	Nama Peneliti	Bidang Keahlian	Fakultas- Jurusan	Perguruan Tinggi
1.	Dr Herry Agoes Hermadi, MSi, drh	Biologi Reproduksi Infertility	Fak. Kedokteran Hewan	Unair
2.	Prof Dr Wurlina MSi	Inseminasi buatan	Fak. Kedokteran Hewan	Unair
3.	Prof Masud H Mphil Phd	USG - Hormonal	FKH	Unair

Biaya yang diajukan ke DIKTI

Tahun Kedua 2011 : Rp. 35.000.000,00  
 Total Biaya : Rp. 35.000.000,00

Surabaya, 21 Nopember 2011  
 Ketua Peneliti



**Dr Herry Agoes Hermadi, MSi, drh**  
 NIP.195908231987031003

Mengetahui,  
 Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
 Universitas Airlangga

**Prof. Hj Romziah Sidik Phd Drh**  
 NIP. NIP.195312161978062001



Menyetujui,  
 Ketua Lembaga Penelitian  
 Universitas Airlangga

**Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi**  
 NIP. 195908051987011001

**Aplikasi human Menopause Gonadotropin (hMG) Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium. Herry Agoes Hermadi, Masud Hariadi, Wurlina. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga 2011.**

**RINGKASAN**

Peningkatan mutu ternak merupakan salah satu aspek utama dalam pengembangan peternakan sapi perah di Indonesia. Beberapa teknologi mutakhir yang telah diciptakan telah digunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak adalah induksi birahi, penanganan kasus infertilitas atau gangguan reproduksi inseminasi buatan, super ovulasi dan transfer embrio. Jenis sapi perah FH (*Friesian Holstein*) mempunyai kemampuan adaptasi, produksi susu dan reproduksi yang cukup baik di Indonesia. Produksi susu sapi perah FH mencapai 6000 kg per laktasi dengan kadar lemak rata-rata 3,6%. Dengan pengelolaan sapi perah laktasi selama 305 hari dan 60 hari masa kering diharapkan akan tercapai jarak beranak (*calving interval*) 12 bulan sehingga sapi perah tersebut dapat beranak setahun sekali. Selain masih rendahnya populasi sapi perah dan produksi susunya, yang sering menjadi masalah adalah gangguan reproduksi pada ternak tersebut yaitu, seringnya terjadi gangguan reproduksi dalam bentuk : Hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pakan, Sering terjadi kawin berulang diikuti dengan servis menunggu birahi 21 hari berikutnya, *Calving interval* yang jauh lebih dari 12 bulan, Angka kelahiran dan kebuntingan yang rendah, Sering dijumpai penggunaan pejantan untuk kawin alami, Inseminasi buatan hanya dilakukan bila terjadi birahi secara alamiah. Teknologi sinkronisasi birahi dan induksi birahi belum dilakukan.

Usaha ternak sapi perah yang dilakukan petani peternak di Indonesia masih dalam taraf berkembang, nampaknya banyak hal mengenai tata laksana beternak sapi perah khususnya dalam mengelola pengetahuan reproduksi dengan pendekatan secara benar antara paramedis, ATR, inseminator dan peternak itu sendiri perlu ditingkatkan.

*Human Menopause Gonadotropin (hMG)* merupakan hormon Gonadotropin yang diekstraksi dari urine perempuan yang telah mengalami *post menopausal*. Secara biologis telah diketahui identik dengan FSH 75 IU dan LH (ICSH) 75 IU aktivitas gonadotropin sesuai dengan *second international references preparation for human menopausal gonadotropin* yang pertama kali dibahas pada tahun 1964 oleh *expert committed on biological standards of WHO* (Anonimus, 1994).

Subyek penelitian ini meliputi aplikasikan *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan \manipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium dengan bantuan alat *ultrasonografi*.

Isolasi protein *hMG* dari urine wanita post menopause telah dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik *coloums chromatography CM Sephadex C-50*. Identifikasi protein *hMG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan elektroelusi untuk uji biologis. (Sudah dilakukan tahun 2008).

*human Menopause Gonadotropin (hMG)* merupakan hormon Gonadotropin yang diekstraksi dari urine wanita yang telah mengalami *post menopausal*. Secara biologis telah diketahui identik dengan FSH 75iu dan LH (ICSH) 75iu aktivitas

gonadotropin sesuai dengan *second international references preparation for human menopausal gonadotropin* yang pertama kali dibahas pada tahun 1964 oleh *expert commited on biological standards of WHO* (Anonimus, 1994). Aplikasi hMG pada sapi, Critzer et al (1982); Gonzalez, et al, (1990); Alcivar et al (1992). Mengamati perubahan hormonal endokrin pada sapi potong betina yang disuperovulasikan dengan FSH-P *Porcine follicle stimulating hormone* dibandingkan *Human Menopause Gonadotropin*. Hasil perbandingan itu ternyata efek hMG jauh lebih baik dari pada FSH-P bila ditinjau kadar hormon E2 17B (estrogen) jauh lebih baik hMG dibanding FSHP. Penelitian pendahuluan telah dilakukan injeksi hMG *serono* pada kambing terhadap birahi dan kebuntingan hasilnya cukup memuaskan (Ratnani dan Hermadi, 1992).

**Tahap Penelitian kedua Tahun 2011:** Melakukan aplikasikan *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk Menguji potensi biologis hMG hasil penelitian terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

**Rumusan Masalah,** berdasarkan permasalahan tersebut di atas maka dapat dirumuskan sebagai berikut : Seberapa jauh pengaruh pemberian hormon hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

**Hipotesis,** Pada penelitian ini dapat diajukan hipotesis sebagai berikut : Terdapat pengaruh hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG. **Tujuan Penelitian** Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut : **Tujuan jangka pendek** Menguji potensi biologis hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG. **Tujuan Jangka Panjang,** Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah : Menentukan suatu model teknologi penanganan infertilitas dan induksi birahi dengan hMG pada hewan coba lainnya dan ternak komersial pada khususnya. **Manfaat Penelitian,** Memberikan informasi data tentang prosedur pemberian hormon hMG pada sapi perah **untuk** menginduksi birahi dan ovulasi.

**Metode Penelitian tentang Pembuatan hMG** hMG dan urine wanita post menopause ditampung 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit, kemudian dilakukan pengadukan dengan mini mixer pada suhu 4 °C selama 12 jam (Hermadi, 2001).Urine dilakukan centrifugasi ulang 3000 rpm 10 menit dilakukan filtrasi coloums chromatography CM sephadex G-100 sigma . Hasil dari filtrasi dimasukkan dalam vial dalam bentuk freze dry di simpan dalam Freezer.

**Metode identifikasi protein hMG dengan Western blot,** *Western blot* dilakukan dengan menggunakan fragmen pita hMG yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dan ditransfer pada membran Nitroselulose (Aulani'am, 2005). 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 anti-hMG 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 *hMG* sehingga bisa diketahui BM isolat *hMG*.

**Melakukan Uji Biologis Terhadap Pertumbuhan Folikel dan Ovarium pada Sapi Perah Penderita Hypofungsi dengan Pantauan USG.** Sebanyak 20 ekor sapi perah betina yang telah dipastikan menderita hypofungsi ovarium. Berumur 2-3 tahun yang mempunyai bodi score minimal 2 sebelumnya diterapi dengan pakan kosentrat susu A protein 15-17% (Phok Phand) 3 kg/hari/ekor selama 1 bulan dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok dengan masing-masing perlakuan mendapatkan 5 ulangan penyuntikan *hMG* hasil penelitian (kelompok perlakuan) / kelompok control disuntik PMSG 1000 IU IM.

Penyuntikan *hMG* diberikan secara intra muscular pada hari ke 9 dengan pola penyuntikan PGF $2\alpha$  (lutalyse) 25 mg dua kali dengan interval 11 hari adapun secara rinci jadwal dosis dan perlakuan adalah sebagai berikut :

- P<sub>0</sub> (kontrol) 5 ekor sapi : Disuntik PMSG 500 IU intra muscular.  
 P<sub>1</sub> (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 300 IU *hMG* hasil penelitian intra muscular.  
 P<sub>2</sub> (Perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 400 IU *hMG* hasil penelitian intra muscular.  
 P<sub>3</sub> (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 500 IU *hMG* hasil penelitian.

#### Jadwal pelaksanaan penyuntikan *hMG*

Hari 0	Hari 9	11	14
I	I	I	I
Penyuntikan PG I 25 mg	PMSG/ <i>hMG</i>	PG2 25mg	USG

**Parameter yang diteliti adalah perkembangan folikel, dan birahi setelah penyuntikan *hMG* hasil penelitian dengan pantauan USG.**

**Hasil penelitian, Pembuatan *hMG*, *hMG*** dari urine 30 wanita post menopause ditampung 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu kamar. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit. Urine dilakukan centrifugasi ulang 3000 rpm 10 menit dilakukan filtrasi columns chromatography CM sephadex G- 100 (*Sigma*) . Selanjutnya urine ditambahkan etanol absolute 5 ; 5 cc kedalam tabung reaksi, kemudian dilakukan aspirasi dengan alat aspirator modifikasi dimana 20 tabung 10 cc dimasukkan kedalam water bath dan dihubungkan dengan sejumlah plastic aspirator dihembuskan dari blowing aspirator pump udara dihembuskan sampai cairan betul – betul menguap., Hasil produksi dimasukkan dalam vial dalam bentuk freeze dry disimpan dalam Freezer.

Hasil isolasi glikoprotein *hMG* dari urin perempuan pascamenopause, kemudian dilakukan karakterisasi dengan teknik *Western blot* Hasil konfirmasi seperti pada Gambar diatas menunjukkan bahwa pita pada Gambar 5.1 ada yang merupakan molekul *hMG* karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap *hMG*, yaitu pita hasil *Western blot* yang ditunjuk dengan panah biru dengan BM 30 kDa.

**Hasil Perlakuan,** Untuk mengetahui perkembangan ovarium dibutuhkan alat *ultrasonografi* (USG) sonovet ex Korea, dengan memasukkan probe ke dalam transrectal dengan memfiksasi permukaan ovarium. Dengan menekan freeze maka gambar permanen akan muncul.

Pada kondisi hypofungsi ovarium ditandai dengan tidak adanya perkembangan folikel sub ordinat yang berukuran rata-rata di bawah 5 mm menjadi dominan folikel yang mempunyai ukuran lebih besar dari 8 mm. Perkembangan folikel ini dipengaruhi

oleh hormon gonadotropin FSH dan LH. Kondisi hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pemeliharaan harus disolusikan dengan pemecahan masalah manajemen dan diikuti dengan pemberian pakan berprotein 18% sebanyak 2% dari berat badan per hari selama 1 bulan. Makanan tambahan berupa hijauan diberikan selama 1 bulan sebanyak 10% dari berat badan.

30 hari setelah perbaikan manajemen pakan dilakukan pemantauan perkembangan folikel pada sapi FH penderita hypo fungsi ovarium untuk melihat perkembangan folikel ordinat menjadi dominan folikel. Selanjutnya dapat dilakukan terapi kombinasi hMG dan PGF $2\alpha$ .

Perkembangan folikel sub ordinat menjadi dominan folikel dapat dipercepat dengan pemberian kombinasi hormon hMG hasil ekstraksi berbagai dosis dengan PGF $2\alpha$  25 mg IM (Capri glandin). Berikut perkembangan dominan folikel dengan ukuran  $\pm$  15 mm.

Hasil penelitian yang telah dilaksanakan Respon hMG Terhadap Perkembangan ovarium Sapi Perah tidak ada perbedaan yang sangat nyata antara kontrol dan perlakuan ( $p > 0,05$ ).

Metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi hMG (CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 5.1. menunjukkan bahwa pita glikoprotein pada Gambar 5.1 adalah molekul hMG karena dikenali oleh monoklonal antibodi hMG. Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui molekul protein urin perempuan pascamenopause adalah molekul hMG yang bereaksi spesifik dengan anti-hMG. Setelah protein ditransfer ke membran nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi primer (anti-hMG) dan sekunder (anti rabbit IgG berlabel AP) maka pita protein dengan menambahkan substrat DAB. Pita protein yang muncul merupakan protein hMG dengan berat molekul 30 kDa Molekul protein yang terlihat pada membran nitroselulose melalui metode SDS-PAGE masih belum spesifik. Karena itu diperlukan uji spesifisitas secara kimia sehingga didapatkan molekul protein yang spesifik sesuai dengan keinginan. Salah satu uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah *Western Blot* (Aulani'am, 2005).

Hasil *Western blot* dapat dilihat pada Gambar 5.1. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal antibodi hMG diyakini adalah protein hMG dengan berat molekul 30 kDa. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian tentang USA *patent Menotropin (hMG) Follitropin (FSH urine)* oleh Band *et al.* (2006), bahwa hMG yang berasal dari urin wanita pascamenopause di Amerika dan Amerika latin dengan metode HPLC *highly purified* dengan SP dan Q *Sepharose* dan dilanjutkan dengan SDS-PAGE menunjukkan berat molekul 20,1–30,00 kDa atau sekitar 25 kDa.

Setelah pita protein hasil penelitian tersebut sesuai dengan berat molekul hMG berkisar 30 kDa selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar glikoprotein, karbohidrat dan protein.

*Western blot* bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks antibodi (anti-hMG) poliklonal–antigen (hMG)–antibodi (anti-hMG) moklonal berlabel enzim. Antibodi sekunder berlabel 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 hMG berikatan secara spesifik dengan antibodi hMG sebagai antibodi primer dan anti rabbit IgG sebagai

antibodi sekunder. Antibodi *hMG* dan anti rabbit IgG dapat mengenali protein *hMG* sebagai pita dengan berat molekul 30 kDa. Karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul *hMG* dengan BM sebesar 30 kDa.

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

Protein *hMG* dengan berat molekul 30 kDa termasuk dalam antigen berpotensi 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 (Baratawidjaja, 2004). Seperti halnya dengan protein *hMG* yang merupakan protein makromolekul mempunyai epitop multideterminan univalen. Karena itu ikatan protein *hMG* dengan antibodi *hMG* menghasilkan afinitas dan aviditas tinggi sehingga terbentuk ikatan yang kuat dan bersifat stabil.

Waktu timbulnya Birahi Setelah Pemberian Berbagai Dosis *hMG* menunjukkan waktu hampir bersamaan sesuai dengan hasil penelitian Hermin dan Hermadi (1997) rata – rata timbulnya birahi 66 jam setelah PGF<sub>2</sub>@ ke dua.

Adanya respon ovarium akibat pemberian *hMG* pada pengamatan menunjukkan korpus luteum sejumlah banyaknya korpus luteum pada permukaan ovarium menunjukkan adanya ovulasi yang terjadi. FSH - LH *like* yang terkandung di dalam *hMG* secara sinergis bekerja sama untuk saling menimbulkan aktivitas di ovarium yaitu menumbuhkan folikel dan ovulasi (Hunter, 1995). Setelah pengamatan korpus luteum dilanjutkan dengan pemeriksaan jumlah folikel dominan sisa yang tidak terovulasikan, folikel dominan yang dimaksud adalah folikel yang berukuran diatas 8 mm yang belum sempat ovulasi terpantau saat pembedahan dilakukan pengukuran secara manual. Armstrong dkk (1982) menyatakan bahwa adanya folikel sisa menunjukkan fluktuasi perkembangan folikel yang tidak bersamaan atau mungkin ketidak mampuan LH untuk menimbulkan ovulasi. Pemberian *hMG* pada sapi perah PE pada penelitian ini menunjukkan respon yang sama pada perbedaan dosis yang diberikan, demikian pula jumlah folikel sisa diperoleh jumlah yang sama seperti yang tertulis pada data di Tabel 3.

Berbagai alasan ilmiah justru folikel dominan sisa dapat berpengaruh pada proses kejadian kebuntingan jika terlalu banyak (Hunter, 1995), sesuai dengan hasil penelitian Hermin dan Hermadi (1997) rata – rata timbulnya folikel dominant yang belum terovulasi hingga 6 jika diberikan dosis normal 1000 IU pada penelitian ini diperoleh rata – rata 2 folikel dominan saja.

Beberapa jam setelah tanda-tanda estrus mulai terlihat, sapi perah diinseminasi buatan dengan semen beku.

**Kesimpulan**, dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu timbulnya birahi ( $66 \pm 2,5819$ ), terdapat perkembangan ovarium dengan adanya sejumlah folikel Dominan ( $2,00 \pm 0,00$ ) setelah penyuntikan berbagai dosis hormon *hMG*.

**Saran**, untuk memperoleh hasil yang maksimal dalam penelitian ini perlu hewan coba yang lebih banyak sehingga dapat dianalisis dengan model statistik sehingga keragaman dosis *hMG* dapat diketahui.

**Bioactivity of *human* Menopausal Gonadotrophin (*hMG*) from Urine of Post-menopausal (Isolated From Hibah bersaing 2008) for Women On *in vitro* Bovine Embryonic cleavage and Manipulate follicle on Ovarium Hypofunction Friesian Holstain Cows**

**Herry Agoes Hermadi  
Masud Hariadi  
Wurlina**

*Department of Reproduction  
Faculty of Veterinary Medicine  
Airlangga University, Surabaya  
email: herrypro59@yahoo.com*

**ABSTRACT**

The aim of this study was to produce hMG from the urine of post-menopausal women on the onset of *in vitro* bovine embryonic cleavage (**Finished on 2010 Hibah Bersaing Tahap I. Now on Hibah Bersaing Tahap II 2011 We Following Manipulate follicle on Ovarium Hypofunction Friesian Holstain Cows**). The study identified hMG from the urine of post-menopausal women by confirmation of the glycoprotein characteristic. Urine samples were collected from 30 post-menopausal women. The results of SDS-PAGE demonstrated that the protein bands ranged between 19.4 and 107 kDa. The protein filtrated by sephadex G- 100 and continued Western blot revealed immune-reactivity of the 30 kDa band.

25 fresian holstain with ovary hypofunction cows after 30 days feeding treatment devided become P0 (control groups) and treatment groups (P1, P2, P3) The time of oestrous after a treatment combinated *hMG* (200, 300, and 500 IU.im) and PGF2 $\alpha$  (25 mg.im) on day 9 with PGF2 $\alpha$  twice interval 11 days is  $72,10 \pm 1,71$  hours not deferences between control (PMSG 500 IU.im) and treatment groups ( $p > 0,05$ ). Total dominant follicles control and treatment ( $p > 0,05$ ) are  $1,00 \pm 0,00$  right ovary and  $0,45 \pm 0,51$  on left ovary used ultrasonography (USG).

**Keywords: hMG, Ovarium Hypofunction, Dominant Folicles.  
Out Put : Haki register on 2012**



**Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi  
(hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi  
Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium**

**Herry Agoes Hermadi  
Masud Hariadi  
Wurlina**

*Department of Reproduction  
Faculty of Veterinary Medicine  
Airlangga University, Surabaya  
email: herrypro59@yahoo.com*

**ABSTRAK PENELITIAN**

Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi formon hMG dari urine wanita menopause dengan tujuan untuk embrio fertilisasi yang sudah dilakukan pada tahun 2010 pada hibah bersaing tahap I. Pada hibah bersaing tahap ke II tahun 2011 dilanjutkan dengan manipulasi hypofungsi ovarium pada sapi perah. Studi mengidentifikasi hMG dari 30 urine wanita post menopause Indonesia dengan konfirmasi SDS-Page dengan protein bands diantara 19,4 dan 107 kDa. Setelah dilakukan filtrasi dengan sephadex G - 100 dilanjutkan dengan Western Blot ditentukan 30 kDa band.

25 ekor sapi betina penderita hypofungsi ovarium setelah mengalami 30 hari terapi pakan kemudian dibagi menjadi kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Waktu timbulnya birahi setelah perlakuan kombinasi hMG 200, 300 dan 500 UI.im dan PGF2 $\alpha$  (25 mg.im) pada hari kesembilan dengan PGF2 $\alpha$  2 kali injeksi dalam interval waktu 11 hari hasilnya adalah tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol (PMSG 500 IU.im) dan perlakuan (hMG) terhadap waktu timbulnya birahi ( $72,10 \pm 1,1$  jam) ( $p > 0,05$ ). Jumlah dominan folikel saat birahi pada ovarium sebelah kiri  $1,0 \pm 0,00$  dan ovarium sebelah kanan  $0,45 \pm 0,51$  dengan pantauan ultrasonografi (USG) tidak ada perbedaan diantara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ( $p > 0,05$ ).

**Keywords : hMG, Ovarium Hypofunction, Dominant Folicles.**  
**Luaran : Produk hMG hasil Isolasi dari Urine Wanita Menopause  
Indonesia Pendaftaran Patent HAKI 2012**

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur Tim Peneliti panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya kepada staf pengajar yang terlibat di dalam penelitian ini, sehingga dapat terselesaikan nya penulisan hasil laporan penelitian yang berjudul ” **Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium.**” yang dibiayai oleh APHB - DIPA DP2M ” Unair tahun 2010- 2011.

Pada kesempatan ini peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

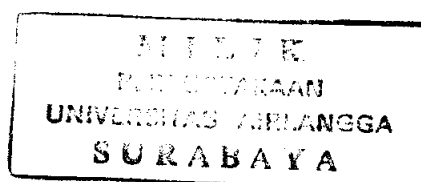
1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Kami menyadari bahwa penelitian ini masih memerlukan banyak penyempurnaan, untuk itu peneliti mengharapkan saran dan kritik dari sejawat. Semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Tim Peneliti

**DAFTAR ISI**

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
<b>LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN DAN SUMMARY.....	ii
ABSTRAK .....	iii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN KEPUSTAKAAN .....	5
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	29
BAB IV METODE PENELITIAN .....	30
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	36
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	44
DAFTAR PUSTAKA .....	45
LAMPIRAN .....	50



**DAFTAR TABEL**

5.1. Tabel Waktu Timbulnya Birahi Sapi Perah .....	39
5.2. Tabel Jumlah Folikel Dominan.....	40

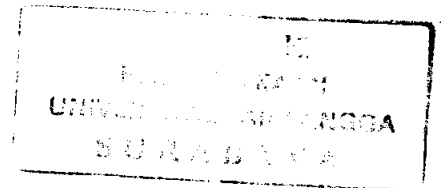
**DAFTAR GAMBAR**

4.1. Tahapan Preparasi Western Blot.....	32
4.2. Gambar Skematis Reaksi Western Blot.....	33
5.1. Karakterisasi hMG Western Blot .....	36
5.2. Hypofungsi Ovarium.....	38
5.3. Folikel Sub Ordinat Sedang Berkembang.....	38
5.4. Dominan Folikel .....	38

**DAFTAR LAMPIRAN**

1. Laboratorium.....	49
2. Perhitungan SPP Anova.....	50
3. Gambar Koleksi Urine dari Wanita Menopause.....	54
4. Bahan Etanol absolut untuk ekstraksi dan bahan sephadex G100.....	54
5. Teknik Penggunaan coloum sephadex dan blowing evaporation.....	54
6. Produk Freeze dry hMG.....	55
7. Cara Penggunaan USG Transrectal.....	55

## BAB I PENDAHULUAN



### I.1 Latar Belakang Penelitian

Peningkatan mutu ternak merupakan salah satu aspek utama dalam pengembangan peternakan sapi perah di Indonesia. Beberapa teknologi mutakhir yang telah diciptakan telah digunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak adalah induksi birahi, penanganan kasus infertilitas atau gangguan reproduksi inseminasi buatan, super ovulasi dan transfer embrio. Jenis sapi perah FH (*Friesian Holstain*) mempunyai kemampuan adaptasi, produksi susu dan reproduksi yang cukup baik di Indonesia. Produksi susu sapi perah FH mencapai 6000 kg per laktasi dengan kadar lemak rata-rata 3,6%. Dengan pengelolaan sapi perah laktasi selama 305 hari dan 60 hari masa kering diharapkan akan tercapai jarak beranak (calving interval) 12 bulan sehingga sapi perah tersebut dapat beranak setahun sekali.

Selain masih rendahnya populasi sapi perah dan produksi susunya, yang sering menjadi masalah adalah gangguan reproduksi pada ternak tersebut yaitu, seringnya terjadi gangguan reproduksi dalam bentuk :

- Hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pakan.
- Sering terjadi kawin berulang diikuti dengan servis menunggu birahi 21 hari berikutnya.
- Calving interval yang jauh lebih dari 12 bulan.
- Angka kelahiran dan kebuntingan yang rendah.
- Sering dijumpai penggunaan pejantan untuk kawin alami.

- Inseminasi buatan hanya dilakukan bila terjadi birahi secara alamiah. Teknologi sinkronisasi birahi dan induksi birahi belum dilakukan.

Usaha ternak sapi perah yang dilakukan petani peternak di Indonesia masih dalam taraf berkembang, nampaknya banyak hal mengenai tata laksana beternak sapi perah khususnya dalam mengelola pengetahuan reproduksi dengan pendekatan secara benar antara paramedis, ATR, inseminator dan peternak itu sendiri perlu ditingkatkan.

*Human Menopause Gonadotropin (hMG)* merupakan hormon Gonadotropin yang diekstraksi dari urine perempuan yang telah mengalami *post menopausal*. Secara biologis telah diketahui identik dengan FSH 75 IU dan LH (ICSH) 75 IU aktivitas gonadotropin sesuai dengan *second international references preparation for human menopausal gonadotropin* yang pertama kali dibahas pada tahun 1964 oleh *expert commited on biological standards of WHO* (Anonimus, 1994).

Subyek penelitian ini meliputi aplikasikan *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan \manipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium dengan bantuan alat *ultrasonografi*.

Isolasi protein *hMG* dari urine wanita post menopause telah dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik coloums chromatography CM Sephadex C-50. Identifikasi protein *hMG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan elektroelusi untuk uji biologis.(Sudah dilakukan tahun 2008).



*human* Menopause Gonadotropin (*hMG*) merupakan hormon Gonadotropin yang diekstraksi dari urine wanita yang telah mengalami post menopausal. Secara biologis telah diketahui identik dengan FSH 75iu dan LH (ICSH) 75iu aktivitas gonadotropin sesuai dengan *second international references preparation for human menopausal gonadotropin* yang pertama kali dibahas pada tahun 1964 oleh *expert committed on biological standards of WHO* (Anonimus, 1994). Aplikasi *hMG* pada sapi, Critzer et al (1982); Gonzalez, et al, (1990); Alcivar et al (1992). Mengamati perubahan hormonal endokrin pada sapi potong betina yang disuperovulasikan dengan FSH-P *Porcine follicle stimulating hormone* dibandingkan *Human Menopause Gonadotropin*. Hasil perbandingan itu ternyata efek *hMG* jauh lebih baik dari pada FSH-P bila ditinjau kadar hormon E2 17B (estrogen) jauh lebih baik *hMG* dibanding FSHP.

Penelitian pendahuluan telah dilakukan injeksi *hMG serono* pada kambing terhadap birahi dan kebuntingan hasilnya cukup memuaskan (Ratnani dan Hermadi, 1992).

**Tahap Penelitian kedua Tahun 2011:** Melakukan aplikasikan *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk Menguji potensi biologis *hMG* hasil penelitian terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

## 1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan permasalahan tersebut di atas maka dapat dirumuskan sebagai berikut : Seberapa jauh pengaruh pemberian hormon *hMG* hasil penelitian hibah

bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

### **I.3. Hipotesis**

Pada penelitian ini dapat diajukan hipotesis sebagai berikut :

Terdapat pengaruh *hMG* hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Beberapa Penelitian Pendahuluan

Telah dilakukan studi pendahuluan injeksi trans ovari dengan menggunakan PGF2 $\alpha$  dosis rendah pada sapi perah. Dosis perlakuan adalah kelompok kontrol diinjeksi 25 mg IM sedangkan kelompok perlakuan dengan dosis rendah trans ovari masing-masing 1 mg, 0,75 mg/ekor dan 0,5 mg/ekor (Malik, 2000). Hasilnya, tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan perlakuan terhadap timbulnya birahi dan kebuntingan pada sapi perah. Hermadi (2003), telah mencoba 25 IU PMSG trans ovari pada sapi perah penderita telah memperoleh perbaikan manajemen pakan selama 2 minggu, hasilnya 3 ekor menunjukkan birahi dan terjadi kebuntingan dan beberapa kasus menunjukkan sistik folikel.

**human menopause gonadotropin** sebagai alternatif pengganti PMSG pertama kali diproduksi dengan *patent merk pergonal dari campany serano laboratories inc. Braintec. MA.* kemasan produksi dalam bentuk hormon injeksi 150 iu. Komponen penting yang saling menunjang dari *human Menopause Gonadotropin* adalah kandungan FSH 75 IU dan LH 75 IU atau lebih dikenal dengan istilah 50:50 persen FSH:LH. Kombinasi yang seimbang antara hormon FSH dan LH kemungkinan kecil terjadi proses sistik ovari atau sistik folikel (Giudice et al, 1994; Westergaad, 1999).

Efek superovulasi yang ditimbulkan oleh PMSG sebaliknya menimbulkan efek samping sistik ovari dan timbulnya antibodi PMSG (anti PMSG) pasca penyuntikan sehingga dibutuhkan dosis yang lebih besar saat penyuntikan ulang,

oleh sebab itu perlu dicarikan alternatif pengganti hormon PMSG (Harjopranyoto, 1995).

Penelitian pendahuluan pada kambing dengan menggunakan 75 IU secara intra muscular 2 hari setelah penyuntikan terjadi proses birahi dan setelah inseminasi buatan menunjukkan angka kebuntingan 100% (Ratnani dan Hermadi, 1992).

*hMG* tidak bersifat spesies spesifik artinya walaupun dihasilkan dari urine wanita post menopause tetapi masih memberikan efek terapi pada wanita resepien atau penderita, bahkan *hMG* dapat dilibatkan langsung dalam proses IVF (Invitro Fertilisasi) pada manusia (Daya S, et al 1995). *hMG* bila dilakukan terapi pada infertilitas wanita bila dibandingkan dengan recombinant human FSH pada perbandingan hasil koleksi oocyte dan perkembangan embryo hasilnya sangat memuaskan (Hung Yu, et al, 2000). Penggunaan *hMG* 85 % oocyte mencapai fase metafase saat perlakuan IVF (Imthurn, B., et al. 1996; Mercan et al, 1997; Agarwal et al, 2000;).

Pembandingan efektivitas FSH dengan *hMG* juga sampai pada tingkat *intracytoplasmic sperm injection* setelah pemberian keduanya secara terpisah menunjukkan hasil yang baik. (Jacob et al, 1998; Weissman, A, 1999).

Pengalaman terapi infertility dengan menggunakan *hMG* untuk ovulasi sejak awal tahun 1960an dan ovarium stimulasi sejak awal 1980 an. Di samping sulitnya melakukan ekstraksi urine dari manusia atau wanita post menopause, kontaminasi protein lain masih terjadi (Giudice et al, 1994). Pada saat pertama ujicoba *hMG* sedikit dijumpai local alergi dan kejadian ini tidak selalu konsisten (Rogers et al, 1995). Efek yang terpenting diketahui bahwa konsentrasi estradiol, tidaklah terlalu terjadi peningkatan drastis sehingga dapat dikatakan sistik ovarii jarang terjadi

(Teissier, et al, 1999 Penggunaan beberapa preparat hormonal. Seperti PMSG dan hMG untuk tujuan perbaikan reproduksi belum banyak dilakukan di lapangan. Salah satu adalah untuk induksi birahi, penanganan infertilitas karena hypofungsi ovarium.

PMSG merupakan hormon gonadotropin dengan berat molekul antara 28.000-30.000 dengan dua rantai yaitu sub unit alfa dan sub unit beta, PMSG tersusun dari glicoprotein dengan kandungan karbohidrat sebesar 40% dan asam sialat yang kadarnya tinggi sebesar 10,4%. Adanya kandungan asam sialat yang tinggi ini dapat memperpanjang waktu paruh PMSG dalam plasma darah sehingga PMSG mempunyai daya kerja yang lebih kuat. Asam sialat mempunyai fungsi melindungi PMSG dari degradasi oleh hati sehingga berpengaruh pada waktu paruhnya (Hafez, 1993). Sulitnya memperoleh preparat FSH menyebabkan hormon PMSG merupakan alternatif untuk teknik superovulasi dan terapi hypofungsi ovarium (Ismudiono, 1992). Madyawati dkk (1994) dalam penelitiannya menggunakan PMSG pada sapi perah untuk induksi birahi dan terjadi kebuntingan. Srianto (1995), dalam penelitian induksi kebuntingan kembar dengan menggunakan hormon PMSG dosis rendah pada sapi perah dan terjadi perubahan hormon steroid di dalam darah. Mustofa (1995), menyebutkan bahwa pemberian PMSG dengan berbagai variasi dosis akan menyebabkan terjadinya perubahan kadar hormon estrogen. PMSG sangat potensial dalam menstimulasi fungsi ovarium, waktu paruhnya panjang memungkinkan untuk menginduksi perubahan folikel dan sering terjadi efek samping sistik folikel (Moor, et al, 1984).

**Induksi birahi** atau gertak birahi atau sinkronisasi birahi bila dilakukan bersamaan adalah upaya untuk memperoleh birahi pada sapi perah setelah

penyuntikan PGF $2\alpha$  pada fase luteal bertujuan untuk melisis korpus luteum berfungsi (Ismudiono, 1992).

*Infertilitas* yang dimaksud dalam penelitian ini mempunyai batasan gangguan reproduksi pada ovarium dengan ditandai tidak munculnya birahi dalam waktu yang cukup lama yang dapat disebabkan karena hipofungsi ovarium.

*Hypofungsi Ovarium* adalah kondisi patologik ovarium karena faktor manajemen pakan, stres lingkungan dan defisiensi hormon. Pada sapi perah menunjukkan gejala anestrus (tidah birahi) dalam waktu yang lama. Kondisi ovarium ukurannya normal permukaannya licin, karena tidak terjadi pertumbuhan folikel (Arthur, 1993). Semua kondisi negatif ini menyebabkan terjadinya gangguan terhadap poros hipotalamus - hipofisa - ovarium. Salah satu manifestasinya adalah menurunkan sekresi *Gonadotropin Releasing Hormon* oleh hipotalamus diikuti menurunnya hormon gonadotropin FSH dan LH serta mengakibatkan tidak tumbuhnya folikel pada ovarium. (Harjopranto, 1995).

*Aplikasi hMG pada sapi*, Alcivar et al (1992); Critzer et al (1982); Gonzalez, et al, 1990). Mengamati perubahan hormonal endokrin ada sapi potong betina yang disuperovulasikan dengan FSH-P *Porcine follicle stimulating hormone* dibandingkan *Human Menopause Gonadotropin*. Hasil perbandingan itu ternyata efek hMG jauh lebih baik dari pada FSH-P bila ditinjau kadar hormon E $2$  17B (estrogen) jauh lebih baik hMG dibanding FSH-P.

Penggunaan hMG pada sapi setrus menunjukkan  $46 \pm 2$  jam. Setelah pemberian, kadar FSH darah,  $45 + 1$  mg/ml LH  $42 + 5$  mg/ml dan kadar Estrogen  $40 \pm 2$  pg/ml (Alcivar et al, 1984; Alcivar, et al, 1992).

## 2.2. Dasar Pertimbangan

Upaya meningkatkan mutu genetik dan productivitas ternak, pemerintah telah memilih bioteknologi untuk mencapai tujuan tersebut, hal ini didukung dengan keluarnya keputusan menteri riset dan teknologi atau ketua BPPT No. 542 / KPIM/ VII/ 1992 yang menetapkan program unggulan bidang bioteknologi peternakan yang meliputi :

- (1) Meningkatkan mutu genetik ternak dengan prioritas pada sapi perah.
- (2) Peningkatan kemampuan reproduksi dan populasi ternak secara cepat dengan prioritas pada sapi perah dan sapi potong.
- (3) Koordinasi produksi bahan biologi dan diagnosa dini penyakit ternak.

Berdasarkan pertimbangan di atas dapat disimpulkan bahwa peranan faktor reproduksi sangat besar dalam upaya meningkatkan mutu genetik dan produktivitas ternak. Teknik IB untuk produksi bibit unggul dan peningkatan populasi sapi perah merupakan pilihan tepat karena memiliki beberapa keunggulan disamping sarana Balai Inseminasi Buatan yang tersedia. Salah satu dari banyak faktor penghambat dari teknik induksi birahi adalah sering terjadinya gangguan reproduksi pada sapi perah, ketidakmampuan peternak untuk mengamati birahi, kurangnya ketrampilan inseminator, belum tersosialisasinya teknik induksi birahi atau gertak birahi sehingga untuk pelaksanaan induksi birahi harus menunggu siklus terjadinya birahi 21 hari kemudian atau birahi alam.

Sesuai dengan kondisi usaha peternakan sapi perah rakyat nampaknya dijumpai beberapa kendala di dalam pengembangannya yaitu :

- Kondisi peternak sapi perah masih dalam tahap berkembang sehingga masih perlu peningkatan pengetahuan mengenai pemeliharaan ternak. Khususnya

reproduksi, recording, peningkatan mutu genetik sapi pada generasi pedet berikutnya.

- Adanya gangguan reproduksi seperti korpus luteum persisten dengan infeksi pasca lahir dalam bentuk dan endometitis, birahi tenang *hypofungsi ovarium* karena manajemen pakan.
- Belum diperkenalkannya teknik induksi birahi secara menyeluruh sehingga bila terjadi kawin berulang harus menunggu 21 hari kemudian.

Atas dasar pertimbangan di atas nampaknya perlu pemecahannya. Diperlukan penanganan terpadu terhadap gangguan reproduksi khususnya hypofungsi ovarium.

Penelitian ini merupakan kaitan yang berkesinambungan dari penelitian lapangan dan rencana dari penelitian disertasi dari program Ilmu Biologi Reproduksi Pasca Sarjana Unair.

Telah dilakukan studi pendahuluan injeksi trans ovari dengan menggunakan PGF2 $\alpha$  dosis rendah pada sapi perah. Dosis perlakuan adalah kelompok kontrol diinjeksi 25 mg IM sedangkan kelompok perlakuan dengan dosis rendah trans ovari masing-masing 1 mg, 0,75 mg/ekor dan 0,5 mg/ekor (Malik, 2000). Hasilnya, tidak terdapat perbedaan antara kelompok kontrol dengan perlakuan terhadap timbulnya birahi dan kebuntingan pada sapi perah. Hermadi (2003), telah mencoba 25 IU PMSG trans ovari pada sapi perah penderita telah memperoleh perbaikan manajemen pakan selama 2 minggu, hasilnya 3 ekor menunjukkan birahi dan terjadi kebuntingan.

*human menopause gonadotropin* pertama kali diproduksi dengan *patent merk* pergonal dari *campany serano laboratories inc. Braintec. MA.* kemasan produksi dalam bentuk hormon injeksi 150 iu. Komponen penting yang saling menunjang dari



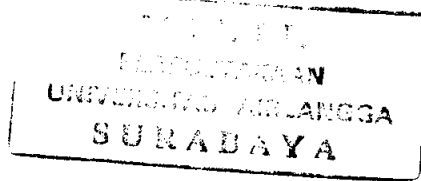
*human* Menopause Gonadotropin adalah kandungan FSH 75 IU dan LH 75 IU atau lebih dikenal dengan istilah 50:50 persen FSH:LH. Kombinasi yang seimbang antara hormon FSH dan LH kemungkinan kecil terjadi proses sistik ovari atau sitik folikel (Giudice et al, 1994; Westergaad, 1999).

Efek super ovulasi yang ditimbulkan oleh PMSG sebaliknya menimbulkan efek samping sistik ovari dan timbulnya antibodi PMSG (anti PMSG) pasca penyuntikan sehingga dibutuhkan dosis yang lebih besar saat penyuntikan. Oleh sebab itu perlu dicarikan alternatif pengganti hormon PMSG (Harjopranyoto, 1995).

*hMG* tidak bersifat spesies spesifik artinya walaupun dihasilkan dari urine wanita post menopause tetapi masih memberikan efek terapi pada wanita resepien atau penderita, bahkan *hMG* dapat dilibatkan langsung dalam proses IVF (Invitro fertilisasi) pada manusia (Daya S, et al 1995). *hMG* bila dilakukan terapi pada infertilitas wanita bila dibandingkan dengan *recombinant human* FSH pada perbandingan hasil koleksi oocyte dan pembangun embryo hasilnya sangat memuaskan. Penggunaan *hMG* 85°C oocyte mencapai fase metafase saat perlakuan IVF (Mercan et al, 1997; Imthurn, B., et al. 1998; Agarwal et al, 2000).

Pembandingan efektivitas FSH dengan *hMG* juga sampai pada tingkat intracytoplasmic sperm injection setelah pemberian keduanya secara terpisah menunjukkan hasil yang baik. (Jacob et al, 1998). (Weissman, A, 1999).

Pengalaman terapi infertility dengan menggunakan *hMG* untuk ovulasi sejak awal tahun 1960an dan ovarium stimulasi sejak awal 1980 an. Di samping sulitnya melakukan ekstraksi urine dari manusia atau wanita post menopause, kontaminasi protein lain masih terjadi (Giudice et al, 1994). Pada saat pertama ujicoba *hMG* sedikit dijumpai local alergi dan kejadian ini tidak selalu konsisten. (Rogers et al,



1995). Efek yang terpenting diketahui bahwa konsentrasi estrodiol, tidaklah terlalu terjadi peningkatan drastis sehingga dapat dikatakan sistik ovari jarang terjadi (Teissier, et al, 1999).

Alcivar et al (1992); Critzer et al (1982); Gonzalez, et al, (1990), mengamati perubahan hormonal endokrim pada sapi potong betina yang disuperovulasikan dengan FSH-P *Porcine follicle stimulating hormone* dibandingkan Human Menopause Gonadotropin. Hasil perbandingan itu ternyata efek hMG jauh lebih baik dari pada FSH-P bila ditinjau kadar hormon E2 17B (estrogen) jauh lebih baik hMG dibanding FSH-P.

Penggunaan hMG pada sapi setrus menunjukkan  $46 \pm 2$  jam. Setelah pemberian, kadar FSH darah,  $45 + 1$  mg/ml LH  $42 + 5$  mg/ml dan kadar Estrogen  $40 \pm 2$  pg/ml (Alcivar et al, 1992); Alcivar, et al 1984).

Cara pemberian hMG diberikan secara berurutan selama 5 hari dengan penyuntikan 2 x sehari secara intra muscular. Total hMG yang diinjeksi 1,050 iu pada awal estrus pada hari ke 9, 10, 11, 12 dan 13 dan PGf2 $\alpha$  (40 mg). IM 60 – 72 jam setelah awal pemberian hMG. Inseminasi buatan dilakukan 48 jam. Setelah PGf2 $\alpha$  injeksi. IB diberikan 3 x interval 12 jam. (Lauria et. Al, 1982; McGowan et al, 1985; Alcivar et al, 1992).

Sugano et al (2001), melakukan super ovulasi pada sapi jepang *japanese Black cattle* dengan *human menopause gonadotropin* dan *porcine follicle stimulating hormone* hasilnya merekomendasikan hMG untuk tujuan super ovulasi.

Lebih detail lagi Suzuki et al (2003), melakukan optimalisasi dengan keberhasilan tinggi menggunakan hMG untuk tujuan super ovulasi pada guinea pigs.

birahi terjadi ovulasi. Perkembangan folikel menjadi masak tergantung adanya hormon FSH dari kelenjar hipofisa anterior. Selama siklus birahi normal, sekresi hormon FSH mendorong folikel menjadi tumbuh dan masak. Sebenarnya banyak folikel yang menjadi tumbuh pada fase permulaan, tetapi hanya sedikit yang masak secara sempurna, sisanya akan mengalami degenerasi, atretis atau menjadi kista (Hardjopranto, 1995).

Pengetahuan mengenai perkembangan folikel pada mamalia semakin meningkat dengan digunakannya peralatan Ultrasonografi (USG). Ultrasonografi dapat memonitor fungsi ovarium dan menambah pengetahuan kita mengenai gelombang folikel. Pada ternak sapi ultrasonografi dapat mendeteksi gelombang folikel selama siklus birahi, dan dekade terakhir ini telah ditemukan pada sapi adanya 2 - 3 pergantian gelombang folikel selama siklus birahi yang lamanya 22 hari, dengan folikel tunggal pada tiap gelombangnya. Jadi, dua atau tiga pergantian folikel dominan terjadi selama satu siklus birahi (Asher et al., 1997; Skidmore et al., 1996).

Untuk siklus birahi dengan dua gelombang pertumbuhan folikel, gelombang pertama terlihat pada saat ovulasi atau hari ke-0 dengan diameter folikel 40 sampai 50 mm. Sedangkan untuk gelombang yang kedua akan terlihat pada hari ke-10 (Ginther et al., 1989).

Penemuan akhir-akhir ini menunjukkan bahwa gelombang pertumbuhan folikel dapat diperpendek maupun diperpanjang dengan melakukan manipulasi terhadap folikel dominan. Estradiol mempunyai pengaruh menyebabkan atresia, sedangkan hCG menyebabkan ovulasi dari folikel dominan. Atresia folikel dominan dapat terjadi apabila estradiol diberikan pada saat folikel mencapai fase pertumbuhan yang maksimal sampai pertengahan fase statik. Demikian pula pada fase tersebut

pemberian hCG dapat merangsang timbulnya ovulasi (Fricke et al., 1993). Baik atresia maupun ovulasi folikel dominan dapat merangsang timbulnya gelombang pertumbuhan folikel yang baru (Hariadi et al., 1997).

## **2.5. Siklus Birahi**

Apabila pubertas telah dicapai dan birahi pertama telah terjadi maka hewan betina akan mulai mengalami proses reproduksi. Jika birahi pertama tidak menghasilkan kebuntingan maka akan dilanjutkan dengan birahi kedua, birahi ketiga dan seterusnya sampai hewan betina menjadi bunting setelah perkawinan. Yang dimaksud dengan satu siklus birahi ialah jarak antara birahi yang satu sampai pada birahi berikutnya, sedangkan birahi itu sendiri adalah saat dimana hewan betina bersedia menerima pejantan untuk kopulasi (Hardopranjoto, 1980).

Dalam satu siklus birahi terjadi perubahan-perubahan fisiologis dari alat kelamin betina. Perubahan ini bersifat sambung-menyambung satu sama lain, hingga bertemu kembali seperti pada permulaannya. Lama siklus birahi pada kambing berkisar antara 20-21 hari. Siklus birahi dibagi menjadi 4 fase, antara lain : proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Hafez, 1980; Partodihardjo, 1980; Toelihere, 1987).

Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan rangsangan pertumbuhan folikel oleh FSH (Follicle Stimulating Hormon). Folikel yang sedang tumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung estradiol. Estradiol meningkatkan pertumbuhan sel-sel epitel dan lapisan bersilia tuba fallopii, vaskularisasi mukosa uterus dan vagina. Pada periode ini sekresi estrogen ke dalam urine tinggi dan mulai terjadi penurunan konsentrasi progesteron di dalam darah.

Pada kambing proestrus berlangsung selama 2-3 hari (Donald, 1971; Fuquay dan Bearden, 1980; Toelihere, 1985).

Estrus ialah periode yang terpenting dalam siklus birahi. Selama periode ini hewan betina akan mencari dan menerima pejantan untuk berkopulasi. Perubahan yang terjadi pada alat kelamin ialah ovarium ada pertumbuhan folikel yang telah dimulai sejak proestrus, meningkat mencapai dimensi maksimal dan disebut dengan folikel de Graaf. Estradiol dari folikel de Graaf menyebabkan perubahan-perubahan pada saluran reproduksi seperti tuba fallopii menegang dan berkontraksi serta ujung dari fimbriae merapat pada folikel de Graaf. Uterus menegang karena suplai darah bertambah dan mukosa vagina menebal serta vulva mengalami oedem (Hafez, 1980; Toelihere, 1985).

Proestrus merupakan periode persiapan yang ditandai dengan rangsangan pertumbuhan folikel oleh FSH (Follicle Stimulating Hormon). Folikel yang sedang tumbuh menghasilkan cairan folikel yang mengandung estradiol. Estradiol meningkatkan pertumbuhan sel-sel epitel dan lapisan bersilia tuba fallopii, vaskularisasi mukosa uteri dan vagina. Pada periode ini sekresi estrogen ke dalam urine tinggi dan mulai terjadi penurunan konsentrasi progesteron di dalam darah. Pada kambing proestrus berlangsung selama 2-3 hari (Donald, 1971; Fuquay dan Berden, 1980; Toelihere, 1985).

Estrus ialah periode yang terpenting dalam siklus birahi. Selama periode ini hewan betina akan mencari dan menerima pejantan untuk berkopulasi. Perubahan yang terjadi pada alat kelamin ialah ovarium ada pertumbuhan folikel yang telah dimulai sejak proestrus, meningkat mencapai dimensi maksimal dan disebut dengan folikel de Graaf. Estradiol dari folikel de Graaf menyebabkan perubahan-perubahan

pada saluran reproduksi seperti tuba fallopii menegang dan berkontraksi serta ujung dari fimbriae merapat pada folikel de Graaf. Uterus menegang karena suplai darah bertambah dan mukosa vagina menebal serta vulva mengalami oedem (Hafez, 1980; Toelihere, 1985). Keseimbangan hormon berubah dari ovarium di bawah pengaruh FSH menjadi di bawah pengaruh LH. Pada kambing periode estrus berlangsung selama 34 – 38 jam (Fuquay dan Bearden, 1980). Sedangkan menurut Toelihere (1985) periode estrus berlangsung selama 1 – 2 hari.

Metestrus atau post estrus adalah periode dimana korpus luteum tumbuh dengan cepat dari sel-sel granulosa folikel yang telah pecah dibawah pengaruh LH. Pada periode ini alat kelamin berada di bawah pengaruh progesteron yang dihasilkan oleh korpus luteum. Lama periode ini kurang lebih sama dengan waktu yang diperlukan ovum untuk mencapai uterus, pada kambing berlangsung selama 3-4 hari (Toelihere, 1985). Apabila kebutuhan tidak terjadi, uterus dan saluran reproduksi beregresi ke keadaan kurang aktif yang disebut diestrus. Korpus luteum berkembang dengan sempurna oleh pengaruh hormon LTH. Sedangkan progesteron akan mempengaruhi dinding uterus menjadi lebih tebal dan kelenjar uterus berkembang sebagai persiapan untuk menerima dan memberi makan embrio serta pembentukan plasenta, bila terjadi pembuahan. Bila tidak terjadi pembuahan, maka korpus luteum kambing akan tetap berfungsi selama kurang lebih 17-19 hari. Lama periode diestrus pada kambing berkisar antara 10-13 hari (Toelihere, 1985).

## 2.6. Perkembangan Folikel

Pada masa perkembangan embrional, ovarium dibentuk dari endoderm. Pada permukaan ovarium foetus diliputi oleh epitel germinativum, yang kemudian

berdifferensiasi menjadi oogonia. Pada waktu lahir, oogonia akan diselaputi sel sehingga berkembang menjadi folikel primer, yang selanjutnya akan menetap sampai masa pubertas. Pada masa pubertas oleh pengaruh hormon FSH yang dihasilkan oleh hipofisis anterior maka folikel primer secara berturut-turut akan berubah menjadi folikel sekunder, folikel tersier dan folikel de Graaf. Folikel primer ditandai dengan adanya selapis sel granulosa, sedang folikel sekunder ditandai dengan adanya lebih dari satu lapis sel granulosa. Dalam perkembangannya folikel sekunder terbentuk suatu membran yang mengelilingi sel telur disebut dengan zona pellucida. Pada perkembangan folikel berikutnya folikel tersier terbentuk suatu antrum folikel yaitu suatu ruangan di dalam folikel yang dikelilingi oleh membran granulosa yang berisi cairan folikel. Pada stadium ini sel telur dikelilingi oleh sel kumulus ooforus yang dihubungkan oleh lapisan tipis sel granulosa. Selanjutnya akan terbentuk folikel de Graaf yang dilapisi oleh dua lapisan stroma yaitu teka interna dan teka eskterna (Sorensen, 1979; Hafez, 2000).

## **2.7. Ovulasi dan Pembentukan Korpus Luteum**

Ovulasi adalah proses terlemparnya sel telur dari ovarium sebagai akibat pecahnya folikel yang telah masak (Hardjoprajoto, 1984). Selama stadium perkembangan folikel, sebagai folikel dapat mencapai stadium folikel de Graaf dan sebagian lagi akan mengalami atresia. Ovulasi pada kambing terjadi antara 12-36 jam setelah terlihat estrus (Smith, 1986). Pada kambing ovulasi menghasilkan 1-4 sel telur dalam satu kali ovulasi (Hafez, 1980). Bila ovulasi terjadi, sel telur yang dilepaskan akan masuk kedalam infundibulum dari tuba fallopii. Setelah terjadi ovulasi terjadilah dari tuba fallopi. Setelah terjadi ovulasi terjadilah kawah bekas

folikel yang dipenuhi oleh darah. Selanjutnya pembekuan darah pada permukaan ovarium ini disebut dengan korpus kaemorhagikum. Kemudian pada lapisan dasar dari kawah yang terdiri dari sisa sel granulosa dan sel telur dan tekainterna, akan mengalami hipertrofi dan hiperplasia dan terbentuklah sel-sel baru berwarna kuning yang disebut sel luteum. Sel luteum jumlahnya bertambah banyak dan memenuhi seluruh kawah, sedang pembekuan darah pada ovarium berkurang. Sel-sel luteum yang tumbuh selanjutnya disebut korpus luteum (Partodihardjo, 1980). Perkembangan korpus luteum pada kambing mulai terbentuk pada hari ke 3-5 dan akan mencapai maksimal pada hari ke 15-17 dari siklus birahi. Bila terjadi kopulasi tetapi tidak terjadi fertilisasi maka korpus luteum akan dinonaktifkan oleh prostaglandin yang dihasilkan oleh uterus. Sedang bila terjadi fertilisasi maka korpus luteum akan terus berkembang dan dipertahankan sampai saat menjelang kelahiran dan dikenal dengan korpus luteum graviditatum. Selama bunting prostaglandin tidak dihasilkan, sehingga proses degenerasi dari korpus luteum tidak terjadi. Korpus luteum berfungsi menghasilkan progesteron untuk mempersiapkan endometrium saat implantasi dan mempertahankan kebuntingan.

## **2.8. Sinkronisasi Birahi**

Sinkronisasi birahi dan superovulasi adalah merupakan tahap awal dari pelaksanaan embrio transfer (Toelihere, 1985). Sinkronisasi birahi adalah suatu upaya yang dilakukan oleh tenaga medis agar hewan betina dewasa dapat dirahi secara bersamaan. Upaya ini mempunyai arti sangat penting, mengingat cara ini merupakan cara yang praktis dalam kaitannya meningkatkan kesuburan ternak sekaligus meningkatkan populasi ternak dari hasil perkawinan. Cara sinkronisasi



birahi pada kambing dapat digunakan preparat  $\text{PGF2}\alpha$  dan dianjurkan penggunaannya 2 kali dengan interval 12 hari, dosis 15 mg per ekor secara intramuskular (Evans, 1987; Hafez, 1980).

## 2.9. Dasar kerja Ultra SonoGrafy (USG)

Alat Ultrasonografi menggunakan gelombang bunyi berfrekuensi tinggi untuk menghasilkan gambar (images) jaringan lunak dan organ internal. Ini serupa dengan sonar yang dipakai untuk memetakan dasar laut. Asal gelombang transduser ultrasound mirip asal gelombang bunyi yang bisa didengar dari drum (Gambar 1). Dalam kondisi istirahat, keseimbangan terjadi diantara molekul-molekul udara pada sisi kepala drum (bunyi audible/bisa didengar) atau diantara molekul-molekul kristal piezoelektrik dari transduser dan jaringan yang dengannya mereka berkontak (ultrasound). Bila kepala drum dipukul, molekul-molekul udara di sisi kepala drum dimampatkan (compressed) dan diregangkan oleh getaran. Hal serupa, jika arus listrik yang bergetar diterapkan pada kristal piezoelektrik dalam transduser, akan dihasilkan karakteristik getaran kristal dan ini menyebabkan gelombang (bunyi) tekanan akustik di jaringan sekitarnya. Gelombang bunyi dimanipulasi melalui jaringan dengan menggerakkan transduser atau memvariasi sudut transduser sesuai kebutuhan. Jaringan memiliki kemampuan merambatkan atau memantulkan gelombang bunyi pada tingkatan berbeda. Proporsi pancaran bunyi yang dipantulkan atau digemakan diterima oleh kristal piezoelektrik sama dalam transduser, yang diubah menjadi impuls listrik, dan ditampilkan pada screen ultrasound sebagai serangkaian titik abu-abu. Gambar real-time atau gambar bergerak yang dihasilkan analog dengan bioskop yang diambil dengan gelombang bunyi di tempat gelombang cahaya.

Karakteristik jaringan menentukan proporsi pancaran bunyi yang akan dipantulkan. Bagian yang dipantulkan ditampilkan pada gambar ultrasound oleh warna abu-abu, yang bervariasi dari hitam ke putih. Zat cair (cairan folikel, cairan kantung kuning telur) tidak memantulkan gelombang bunyi (yaitu, bersifat nonekoik atau anekoik); karena itu, gambar struktur yang mengandung zat cair akan kelihatan hitam pada screen. Pada sisi lainnya, jaringan padat (tulang janin, serviks bovine) memantulkan banyak pancaran bunyi (yaitu, bersifat hiperekogenik atau hiperekoik) dan kelihatan putih pada screen. Banyak jaringan lain terlihat dalam berbagai warna abu-abu bergantung pada ekogenisitas atau kemampuan memantulkan gelombang bunyinya. Skala abu-abu bisa didefinisikan sebagai perkembangan warna abu-abu yang berubah dari hitam ke putih. Banyak instrumen ultrasound mampu menampilkan 16 warna abu-abu dan instrumen ultrasound lainnya menampilkan skala abu-abu sampai 64 tahap. Pancaran bunyi yang melewati jaringan sangat tipis (yaitu, 2 mm); karena itu, pancaran secara akustik menyampelkan “irisasi” jaringan. Gambar dua-dimensi yang terlihat pada screen analog dengan potongan histologis organ, yang memungkinkan ultrasonographer memperlihatkan struktur secara detail yang mendekati seperti melihat spesimen histologis.

Ketika bunyi audible menjalar, gelombang akan melemah atau menipis. Gema dari frekuensi dan kecepatan sama sebagai gelombang bunyi primer akan dihasilkan jika gelombang bunyi menabrak rintangan sebelum ia terlalu lemah untuk kembali (Gambar 2). Gema yang kembali bisa diterima oleh telinga seseorang yang memukul drum dan jarak dari drum ke rintangan (barrier) dapat diperkirakan dengan menggunakan kecepatan bunyi dalam udara (sekitar 330 m/detik). Hal serupa, gelombang ultrasound merambat melewati tubuh (sekitar 1540 m/detik) hingga

reflektor jaringan dicapai. Banyak gelombang dipantulkan dan kembali ke kristal; banyak gelombang terus berinteraksi dengan struktur yang lebih dalam. Gema yang kembali mengkompresi kristal piezoelektrik yang, pada gilirannya, menghasilkan tenaga listrik yang dikirimkan ke penerima. Kelambatan waktu (time delay) antara perambatan gelombang dan penerimaan gema yang kembali digunakan untuk menghitung jarak dari kristal ke reflektor jaringan.

Tubuh terdiri banyak lapisan jaringan. Interface jaringan akan terjadi bilamana jaringan berdensitas berbeda atau impedansi akustik berbeda bertemu. Impedansi akustik merupakan ukuran resistansi jaringan terhadap perambatan gelombang ultrasound. Perbedaan yang sangat kecil dalam densitas jaringan dapat menyebabkan interface. Densitas dan organisasi jaringan juga menyebabkan pola ultrasonik yang karakteristik, atau ekotekstur, yang memungkinkan identifikasi banyak organ internal (Gambar 3). Selain itu, ekotekstur organ reproduksi bisa bervariasi bergantung pada status reproduksi (estrus, diestnis, atau anestrus). Misalnya, terjadi perubahan morfologis di uterus dalam merespon pola sekresi hormon indung telur. Perubahan morfologis ini dicerminkan dalam ekotekstur uterus. Ekotekstur uterus kuda betina atau sapi betina yang sedang birahi mudah dibedakan dari hewan yang sedang tidak birahi (diestrus).

Cara tenaga penggerak peralatan ini bergantung pada frekuensi gelombang bunyi. Frekuensi menunjuk pada jumlah getaran sumber akustik per detik. Frekuensi yang tinggi akan memberikan detail yang lebih besar, sedang frekuensi yang lebih rendah akan menghasilkan penetrasi jaringan yang lebih besar. Frekuensi ultrasound diukur dalam megahertz (MHz; 1 MHz = 1.000.000 gelombang bunyi per detik). Frekuensi berbagai transduser analog dengan berbagai kekuatan kaca objektif

mikroskop cahaya. Dengan transduser berfrekuensi rendah atau kaca objektif berkekuatan rendah, luas daerah yang terlihat akan lebih besar, tetapi kurang detail (rinci). Dengan transduser berfrekuensi tinggi atau kaca objektif berkekuatan tinggi, daerah yang terlihat lebih kecil atau sempit, tetapi detailnya lebih besar. Transduser berfrekuensi lebih rendah (misalnya, 3-3,5 MHz) cocok untuk melihat struktur yang lebih besar pada jarak yang lebih besar dari transduser (misalnya, penggambaran janin besar). Transduser berfrekuensi tinggi (misalnya, 5-7,5 MHz) dimaksudkan untuk mempelajari struktur detail yang dekat dengan transduser (misalnya, mengevaluasi ovarium dan uterus) dan lebih baik untuk pemeriksaan intrarektal saluran reproduksi kuda dan sapi.

Instrumen ultrasound yang dipakai untuk memeriksa saluran reproduksi kuda dan sapi berupa *A-mode scanner*, *real-time scanner*. *A-mode* menunjuk pada modalitas kejernihan, dimana ultrasonic imaging berupa display titik-titik dua-dimensi. Kejernihan titik-titik sebanding dengan amplitudo gema yang kembali. *Real-time imaging* menunjuk pada display "live" atau display bergerak dimana gema (*echo*) direkam dan diperbarui terus-menerus. Ada dua tipe dasar instrumen ultrasound *real-time* dan *A-mode* yang tersedia di pasar veteriner: *linear-array scanner* dan *sector scanner*. Dalam *linear-array scanner*, gelombang bunyi dikeluarkan tegak lurus dengan transduser disepanjang deretan kristal. Gelombang-gelombang yang dihasilkan oleh setiap kristal menjalar sebanding gelombang yang dihasilkan oleh kristal-kristal sekitar menurut pola/susunan linier atau garis. Karena itu, gambar yang dihasilkannya akan tegak lurus; lebar gambar sesuai dengan panjang bagian aktif transduser. Gambar jaringan yang paling mendekati transduser terdapat di bagian atas screen. Potongan (*sections*) biasanya terletak di bidang sagital tubuh. Gambar jaringan di ujung transduser akan ditampilkan di sisi kiri atau sisi kanan monitor

video bergantung pada rancangan scanner. Banyak scanner dilengkapi dengan fasilitas pembalikan gambar yang memungkinkan penampilan gema dari ujung transduser yang ditempatkan di sisi kanan atau kiri monitor sesuai pilihan operator. Untuk kemudahan orientasi (penentuan posisi) dan konsistensi dengan modalitas imaging lainnya, display yang lebih baik biasanya dengan aspek kranial hewan pada sisi kiri gambar ultrasound. Untuk pemeriksaan intrarektal reproduksi hewan besar, kiranya penting memilih sebuah mesin dengan probe tahan lama dan atraumatik yang dirancang khusus untuk insersi intrarektal. Sector scanners menghasilkan gambar berbentuk "sepotong kue" (slice of pie) dan dibeli langsung dari pasar medis manusia untuk penggunaan veteriner. Penggunaan tipikal sector scanner di bidang veteriner berupa penggambaran (imaging) tendon di kaki kuda atau penggambaran struktur dada dan perut di hewan kecil.

### **USG dengan Tehnik Transrektal**

Hewan sapi betina untuk pemeriksaan ultrasound (pengekanan, evakuasi rektum) mirip sediaan untuk pemeriksaan rektum. Produksi gambar ultrasound dan interpretasi gambar oleh operator merupakan interaksi empat faktor: operator, scanner, lingkungan, dan hewan. Pengalaman operator sangat penting untuk mendeteksi struktur dan perbedaan diantara jaringan. Probe harus dimanipulasi sehingga seluruh uterus dapat diperiksa secara sistematis. Scanner berkualitas tinggi, lebih baik dengan probe 5 MHz, penting untuk mendeteksi atau mengetahui struktur kecil (misalnya, folikel < 5 mm, konsepsi equine Hari 11), Scanner sebaiknya diposisikan dekat operator dan dekat mata untuk memudahkan melihatnya dan melakukan penyesuaian, tetapi hati-hati dengan kerusakan potensialnya. Juga harus tersedia outlet listrik yang bebas dari interferensi listrik. Intensitas cahaya sekitar harus suram untuk mengurangi pantulan dan menghindari kecerahan berlebihan atau

mengurangi tempat kontras (memantulkan) pada screen. Hewan harus dikendalikan dengan baik, karena gerakan berlebihan akan mengganggu interpretasi gambar ultrasound. Karena itu, fasilitas yang cocok untuk mengekang hewan untuk pemeriksaan rektum secara manual mungkin tidak memuaskan untuk pemeriksaan ultrasonik. Jika tinja mudah berantakan atau lengket, akan lebih sulit mengevakuasi rektum atau mengadakan kontak yang baik antara probe dan mukosa rektum. Keberadaan udara antara permukaan akustik probe dan mukosa tinja sangat mengurangi kualitas gambar dan harus dihilangkan. Disini periu digunakan gel coupling. Gel yang dipakai sebagai media coupling viskositasnya harus tepat dan bebas gelembung udara. Akan membantu jika anda membuat area kerja terpusat dimana semua faktor penting yang menyumbang pembuatan gambar ultrasound yang bagus bisa dikendalikan dan investasi besar berupa scanner ultrasound harus diselamatkan. Waktu diperlukan untuk pemeriksaan ultrasound atas saluran reproduksi sama dengan waktu yang diperlukan untuk pemeriksaan rektum secara manual.

Hubungan antara orientasi linear-array transducer dan orientasi badan dan tanduk uterin ditunjukkan untuk kuda betina (Gambar 8). Karena transduser umumnya dipegang di bidang sagital, gambar serviks dan badan uterin terorientasi (posisi) secara longitudinal berkait tubuh hewan. Tanduk uterin pada kuda betina terlihat dalam cross-section bila transduser digerakkan ke kanan atau kiri. Karena bergantung orientasi tanduk uterin saat pemeriksaan, maka kita perlu menggerakkan transduser ke kanan atau ke kiri guna memperoleh cross-section. Akan tetapi, pada sapi, uterus bergulung-gulung dan melingkar-lingkar, dan bentuknya berubah-ubah bergantung siklus birahi. Anatomi ultrasonik harus dipahami betul pada sapi betina dewasa atau sapi dara (heifer) guna memastikan kalau seluruh uterus diperiksa. Tata

cara yang bekerja dengan baik di laboratorium kami adalah sebagai berikut: setelah pembuangan materi tinja, transduser ultrasound ditutup dengan coupling gel dan diinsersikan (dimasukkan) ke rektum.

Serviks dicari posisinya dan badan uterus diperiksa dalam potongan longitudinal. Serviks biasanya mudah dicari posisinya disebabkan meningkatnya respon ekogenik plicae circularis. Transduser dipindahkan ke permukaan dorsal badan uterin dan digeser sedikit dari satu sisi ke sisi sehingga seluruh luas tubuh terperiksa. Bila tempat-temu corpus-cornual dicapai, transduser digerakkan pada permukaan dorsal satu tanduk uterin, sehingga tanduk itu diperiksa di bidang miring. Kemudian transduser diputar secara lateral untuk memeriksa ovarium. Tanduk dan ovarium diperiksa menurut pola sama. Linear-array transducer menghasilkan gambar longitudinal berkait tubuh hewan. Karena itu, kurva utama dari tanduk uterin diperlihatkan sebagai struktur berbentuk-kait yang melengkung kearah dasar screen ultrasound. Spiral bagian distal tanduk uterin menghasilkan gambar miring untuk tanduk. Gambar cross-sectional tanduk uterin pada sapi seringkali tidak terlihat. Seringkali, potongan uterus tidak diperiksa secara memadai karena operator menggerakkan transduser terlalu cepat pada koil tanduk uterin yang berliku-liku. Bila mencari struktur kecil (misalnya, vesikel embrio muda), transduser harus digerakkan secara lamban. Pancaran atau sorotan tampak sangat tipis dan dengan cepat melewati struktur kecil. Dalam kaitan ini, vesikel embrio kembar pada kuda betina menghasilkan efek "flashing" ganda bila mereka saling berdekatan atau si kembar itu terlewatkan jika transduser digerakkan terlalu cepat. Pada kuda betina, pemeriksaan seksama atas seluruh panjang badan uterin juga penting dalam diagnosa kebuntingan muda karena vesikel embrio yang sangat mobil sering terdapat di tubuh dan dekat serviks sebelum fiksasinya di bagian kauda tanduk uterin pada hari ke-16. Selain itu,

perubahan siklus dan perubahan patologis yang kelihatan secara ultrasonik lebih menonjol di badan uterin.

Bila transduser digerakkan dibawah ujung tanduk kuda betina, permukaan medial ovarium tersuspensi akan tercapai Karena itu, gambar potongan ovarium biasanya diorientasikan dari permukaan medial (bagian atas screen) ke permukaan lateral (dasar screen) dengan kutub kranial ovarium ke kiri dan kutub kauda ke kanan dengan alat scanner untuk orientasi yang lebih tepat. Melihat orientasi ovarium lebih mudah pada sapi dibanding pada kuda. Pada sapi, kutub kranial dan lekuk ovarium hampir pasti dapat diidentifikasi. Pada kuda betina, identifikasi kutub kranial dan kutub kauda ovarium lebih sulit. Akan tetapi, ovarium baik pada kuda betina maupun pada sapi sangat mobil (mudah bergerak), dan potongannya mungkin melibatkan bidang lain atau orientasi mungkin berubah ketika pemeriksaan sedang dilakukan. Pancaran ultrasound menyampelkan "irisan" sekuensial ovarium bila transduser diputar; pastikan seluruh ovarium terkena. Segmen intestin atau lemak menutupi ovarium dan, karena itu, kadang perlu mereposisi ovarium agar mudah mencari posisi atau tempatnya dengan tepat atau mendapatkan gambaran yang jelas. Pada sapi, saluran reproduksi berubah posisi, yang memerlukan reposisi.



## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN KE II**

#### **3.1 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut :

##### **3.1.1 Tujuan jangka pendek**

Menguji potensi biologis *hMG* hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

##### **3.1.2. Tujuan Jangka Panjang**

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah :  
Menentukan suatu model teknologi penanganan infertilitas dan induksi birahi dengan *hMG* pada hewan coba lainnya dan ternak komersial pada khususnya.

#### **3.2 Manfaat Penelitian**

Memberikan informasi data tentang prosedur pemberian hormon *hMG* pada sapi perah untuk menginduksi birahi dan ovulasi.

## **BAB IV**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1. Kerangka Umum Pemecahan Masalah**

Untuk memecahkan masalah dalam penelitian ini maka dibuat kerangka umum pemecahan masalah yang nantinya akan dijabarkan kedalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri atas dua tahap sebagai berikut :

#### **4.2. Tahap Penelitian kedua Tahun 2011**

##### **4.2.1. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai bulan Mei 2011 dan berakhir bulan September 2011 di Laboratorium Ilmu Kemajiran Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Peternakan sapi perah FH *Friesian Holstain* dipelihara di kandang milik Bapak Frans Desa Gampang RT 6 Kecamatan Prambon Kabupaten Sidoarjo.

##### **4.2.2. Alat-Alat**

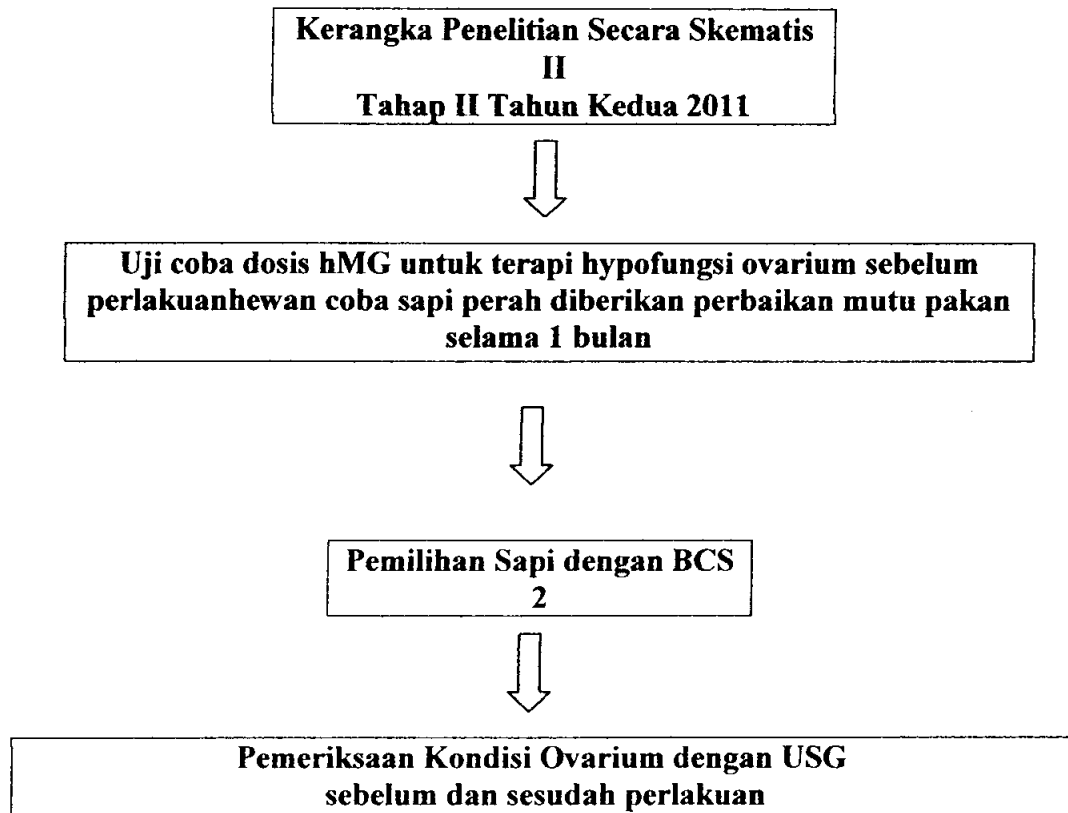
Tabung untuk koleksi urine, Alat suntik plastik yang berukuran 1, 5, atau 10 ml dengan jarum berukuran 18 *gauge* dan termos. *Milipore filter* dengan diameter 0,22 um Mikropipet yang terdiri dari pipet pemegang dan pipet pengisap, plastik Glove, kontainer N2, sepadex G 50 dan USG Sonovet Western Blot.

##### **4.2.3. Bahan dan Peralatan Penelitian**

Pada penelitian ke II dibutuhkan hewan coba sapi perah betina 20 ekor penderita hypofungsi ovarium yang telah diberi terapi pakan dengan BSC (Body Score Condition) 2 (dua) untuk diterapi dengan *hMG* hasil penelitian.

### 4.2.3 Metode Penelitian

Digambarkan dalam kerangka penelitian secara skematis tiga tahap dari tahun 2011 adalah sebagai berikut :



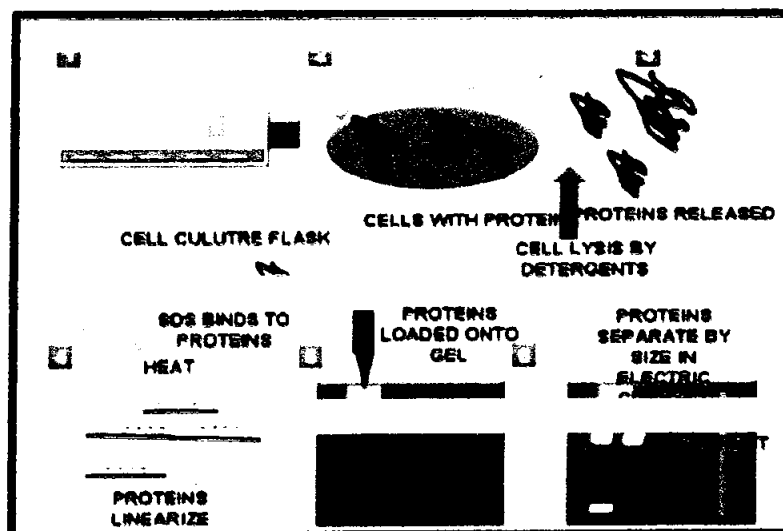
### 4.2.4. Pembuatan hMG

hMG dan urine wanita post menopause ditampung 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit, kemudian dilakukan pengadukan dengan mini mixer pada suhu 4°C selama 12 jam (Hermadi, 2001). Urine dilakukan centrifugasi ulang 3000 rpm 10 menit dilakukan filtrasi coloums

chromatography CM sephadex G-100 sigma. Hasil dari filtrasi dimasukkan dalam vial dalam bentuk freeze dry di simpan dalam Freezer.

#### 4.2.5. Metode identifikasi protein *hMG* dengan *Western blot*

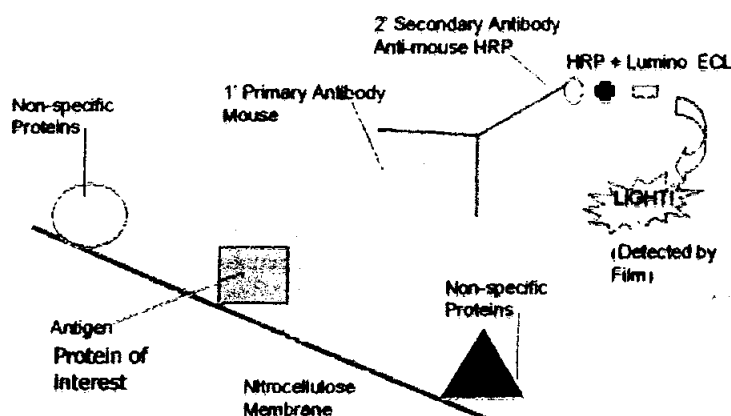
*Western blot* dilakukan dengan menggunakan fragmen pita *hMG* yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dan ditransfer pada membran Nitroselulose (Aulani'am, 2005). Tahapan *western blot* secara skematis dapat dilihat pada Gambar 4.2.



**Gambar 4.1.** Tahapan preparasi *Western blot*. Sumber: Molecular Station (2006)

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 anti-*hMG* 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 *hMG* sehingga bisa

diketahui BM isolat *hMG*. Reaksi yang terjadi pada *Western Blot* secara skematis dapat dilihat pada Gambar 4.3.



**Gambar 4.2** Gambar skematis reaksi pada *Western blot*. Sumber: Molecular Station (2006)

#### 4.2.6. Melakukan Uji Biologis Terhadap Pertumbuhan Folikel dan Ovarium pada Sapi Perah Penderita Hypofungsi dengan Pantauan USG.

Sebanyak 20 ekor sapi perah betina yang telah dipastikan menderita hypofungsi ovarium. Berumur 2-3 tahun yang mempunyai bodi score minimal 2 sebelumnya diterapi dengan pakan kosentrat susu A protein 15-17% (Phok Phand) 3 kg/hari/ekor selama 1 bulan dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok dengan masing-masing perlakuan mendapatkan 5 ulangan penyuntikan *hMG* hasil penelitian (kelompok perlakuan) / kelompok control disuntik PMSG 1000 IU IM.

Penyuntikan *hMG* diberikan secara intra muscular pada hari ke 9 dengan pola penyuntikan PGF2 $\alpha$  (lutalyse) 25 mg dua kali dengan interval 11 hari adapun secara rinci jadwal dosis dan perlakuan adalah sebagai berikut :

P<sub>0</sub> (kontrol) 5 ekor sapi : Disuntik PMSG 500 IU intra muscular.

P<sub>1</sub> (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 300 IU hMG hasil penelitian intra muscular.

P<sub>2</sub> (Perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 400 IU hMG hasil penelitian intra muscular.

P<sub>3</sub> (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 500 IU hMG hasil penelitian.

#### Jadwal pelaksanaan penyuntikan hMG

Hari 0	Hari 9	11	14
I			I I
I Penyuntikan PG I 25 mg	PMSG/ hMG	PG2 25mg	USG

**Parameter yang diteliti adalah perkembangan folikel, dan birahi setelah penyuntikan hMG hasil penelitian dengan pantauan USG.**

#### 4.2.7. Deteksi Birahi

Deteksi birahi dilakukan sehari, yaitu sepanjang hari mulai hari ke 14 . Tanda – tanda birahi pada sapi perah antara lain; alat kelamin luar tampak membengkak, basah, merah dan hangat; menggerak-gerakkan ekornya; diam bila dikawini atau dinaiki oleh pejantan atau ternak lain; gelisah dan nafsu makan menurun (Ludgate, 1989).

#### 4.2.8. Rancangan dan Analisis Statistik Rancangan dan Analisis Statistik

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dan analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis kuantitatif dan kualitatif secara

proporsional. Beberapa macam analisis data yang digunakan adalah : analisis sidik ragam (Anova) dan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) terhadap birahi dan pertumbuhan folikel (Steel and Torrie, 1995).

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN PENELITIAN

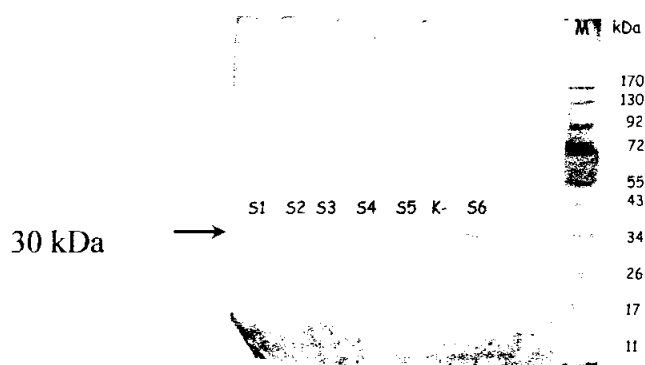
#### 5.1. Hasil Penelitian

##### 5.1.1. Pembuatan hMG

hMG dari urine 30 wanita post menopause ditampung 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu kamar. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit. Urine dilakukan centrifugasi ulang 3000 rpm 10 menit dilakukan filtrasi coloums chromatography CM sephadex G- 100 (*Sigma*) . Selanjutnya urine ditambahkan etanol absolute 5 ; 5 cc kedalam tabung reaksi, kemudian dilakukan aspirasi dengan alat aspirator modifikasi dimana 20 tabung 10 cc dimasukkan kedalam water bath dan dihubungkan dengan sejumlah plastic aspirator dihembuskan dari blowing aspirator pump udara dihembuskan sampai cairan betul – betul menguap. Hasil produksi dimasukkan dalam vial dalam bentuk freeze dry disimpan dalam Freezer.

Hasil isolasi glikoprotein hMG dari urin perempuan pascamenopause, kemudian dilakukan karakterisasi dengan teknik *Western blot* disajikan pada Gambar

5.1.



**Gambar 5.1. Karakterisasi glikoprotein hMG hasil isolasi dari urin perempuan pascamenopause dengan teknik *Western blot*. M = Marker Protein, S1-S6=sampel urin perempuan pascamenopause, → = Menunjuk pita protein BM 30 kDa yang dikenali oleh Mab-hMG, K- = Kontrol negatif.**

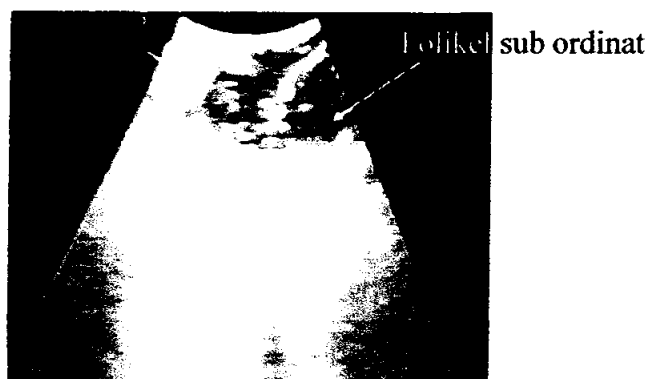


Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 5.2. menunjukkan bahwa pita pada Gambar 5.1 ada yang merupakan molekul *hMG* karena dikenali oleh antibodi monoklonal terhadap *hMG*, yaitu pita hasil *Western blot* yang ditunjuk dengan panah biru dengan BM 30 kDa.

### 5.1.2. Hasil Perlakuan

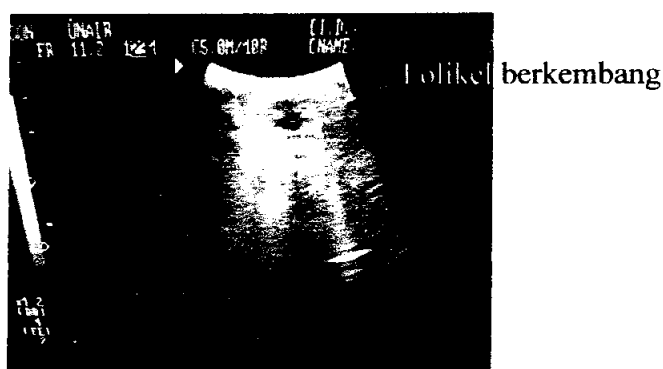
Untuk mengetahui perkembangan ovarium dibutuhkan alat *ultrasonografi* (USG) sonovet ex Korea, dengan memasukkan probe ke dalam transrectal dengan memfiksasi permukaan ovarium. Dengan menekan freeze maka gambar permanen akan muncul.

Pada kondisi hypofungsi ovarium ditandai dengan tidak adanya perkembangan folikel sub ordinat yang berukuran rata-rata di bawah 5 mm menjadi dominan folikel yang mempunyai ukuran lebih besar dari 8 mm. Perkembangan folikel ini dipengaruhi oleh hormon gonadotropin FSH dan LH. Kondisi hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pemeliharaan harus disolusikan dengan pemecahan masalah manajemen dan diikuti dengan pemberian pakan berprotein 18% sebanyak 2% dari berat badan per hari selama 1 bulan. Makanan tambahan berupa hijauan diberikan selama 1 bulan sebanyak 10% dari berat badan.



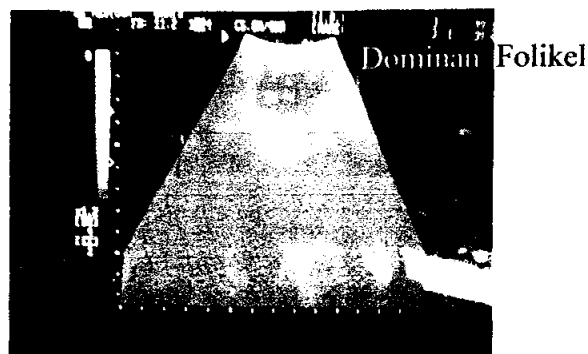
**Gambar. 5.2. Hypo fungsi Ovarium**

30 hari setelah perbaikan manajemen pakan dilakukan pemantauan perkembangan folikel pada sapi FH penderita hypo fungsi ovarium untuk melihat perkembangan folikel ordinat menjadi dominan folikel. Selanjutnya dapat dilakukan terapi kombinasi *hMG* dan *PGF2 $\alpha$* .



**Gambar. 5.3. Gambar Folikel Sub Ordinat yang Sedang Berkembang**

Perkembangan folikel sub ordinat menjadi dominan folikel dapat dipercepat dengan pemberian kombinasi hormon *hMG* hasil ekstraksi berbagai dosis dengan *PGF2 $\alpha$*  25 mg IM (Capri glandin). Berikut perkembangan dominan folikel dengan ukuran  $\pm$  15 mm.



**Gambar 5.4. Dominan Folikel.**

Hasil penelitian yang telah dilaksanakan Respon *hMG* Terhadap Perkembangan ovarium Sapi Perah dapat dilihat pada data sebagai berikut dibawah ini :

**Tabel 5.1. Waktu timbulnya Birahi Sapi Perah Setelah Pemberian Berbagai Dosis *hMG* Hari ke 9 dan Prostatglandin hari ke 11**

Kelompok Perlakuan	Waktu (jam)
PMSG 500 IU	72,1 ± 1,48
<i>hMG</i> 150 IU	72,1 ± 2,30
<i>hMG</i> 225 IU	71,4 ± 1,81
<i>hMG</i> 300 IU	72,2 ± 1,48
$X \pm sd$	72,10 ± 1,71

Pada data di atas tidak ada perbedaan yang sangat nyata antara kontrol dan perlakuan ( $p > 0,05$ )

Adapun perkembangan folikel setelah pemberian berbagai dosis *hMG* dapat dilihat pada tabel di bawah ini dengan pemberian dosis 75 IU PMSG, 150 IU *hMG* 225 IU *hMG* dan 300 IU *hMG*.

**Tabel 5.2. Jumlah Folikel Dominan Setelah Pemberian Berbagai Dosis hMG dengan pantauan USG.**

FOLIKEL DOMINAN			
No.Kelompok		Ovarium Kanan	Ovarium Kiri
1	500 IU <i>PMSG</i>	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.54
2	150 IU <i>hMG</i>	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.54
3	225 IU <i>hMG</i>	1.00 ± 0.00	0.40 ± 0.54
4	300 IU <i>hMG</i>	1.00 ± 0.00	0.60 ± 0.54
X ± SD		1,00 ± 0.00	0,45 ± 0,51

Pada data di atas tidak ada perbedaan yang sangat nyata antara kontrol dan perlakuan ( $p > 0,05$ ).

## 5.2 Pembahasan Penelitian

Metode *Western blot* menggunakan monoklonal antibodi *hMG* (CSA 614 stress Gen Bioreagen). Hasil konfirmasi seperti pada Gambar 5.5. menunjukkan bahwa pita glikoprotein pada Gambar 5.5 adalah molekul *hMG* karena dikenali oleh monoklonal antibodi *hMG*. Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui molekul protein urin perempuan pascamenopause adalah molekul *hMG* yang bereaksi spesifik dengan anti-*hMG*. Setelah protein ditransfer ke membran nitroselulose dan direaksikan dengan antibodi primer (anti-*hMG*) dan sekunder (anti *rabbit* IgG berlabel AP) maka pita protein dengan menambahkan substrat DAB. Pita protein yang muncul merupakan protein *hMG* dengan berat molekul 30 kDa Molekul protein yang terlihat pada membran nitroselulose melalui metode SDS-PAGE masih belum spesifik. Karena itu diperlukan uji spesifisitas secara kimia sehingga didapatkan

molekul protein yang spesifik sesuai dengan keinginan. Salah satu uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah *Western Blot* (Aulani'am, 2005).

Hasil *Western blot* dapat dilihat pada Gambar 5.5. Pita protein yang dikenali oleh antibodi monoklonal antibodi *hMG* diyakini adalah protein *hMG* dengan berat molekul 30 kDa. Bila dibandingkan dengan hasil penelitian tentang USA *patent Menotropin (hMG) Follitropin (FSH urine)* oleh Band *et al.* (2006), bahwa *hMG* yang berasal dari urin wanita pascamenopause di Amerika dan Amerika latin dengan metode HPLC *highly purified* dengan SP dan Q *Sepharose* dan dilanjutkan dengan SDS-PAGE menunjukkan berat molekul 20,1–30,00 kDa atau sekitar 25 kDa.

*Western blot* bergantung pada antibodi primer untuk mendeteksi protein yang ada pada membran atau gel. Penambahan antibodi sekunder akan terbentuk kompleks antibodi (anti-*hMG*) poliklonal–antigen (*hMG*)–antibodi (anti-*hMG*) monoklonal berlabel enzim. Antibodi sekunder berlabel 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 *hMG* berikatan secara spesifik dengan antibodi *hMG* sebagai antibodi primer dan anti rabbit IgG sebagai antibodi sekunder. Antibodi *hMG* dan anti rabbit IgG dapat mengenali protein *hMG* sebagai pita dengan berat molekul 30 kDa. Karena itu dapat diyakini bahwa pita yang muncul pada SDS-PAGE adalah pita molekul *hMG* dengan BM sebesar 30 kDa.

Pengenalan protein spesifik *hMG* oleh antibodi *hMG* melibatkan ikatan nonkovalen dan reversibel. Kekuatan ikatan antara protein *hMG* dengan antibodi

tergantung faktor elektrostatis, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan jumlah epitop (Baratawidjaja, 2004).

Protein *hMG* dengan berat molekul 30 kDa termasuk dalam antigen berpotensi 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 (Baratawijaya, 2004). Seperti halnya dengan protein *hMG* yang merupakan protein makromolekul mempunyai epitop multideterminan univalen. Karena itu ikatan protein *hMG* dengan antibodi *hMG* menghasilkan afinitas dan aviditas tinggi sehingga terbentuk ikatan yang kuat dan bersifat stabil.

Waktu timbulnya Birahi Setelah Pemberian Berbagai Dosis *hMG* menunjukkan waktu hampir bersamaan sesuai dengan hasil penelitian Hermin dan Hermadi (1997) rata – rata timbulnya birahi 66 jam setelah  $PGF_2\alpha$  ke dua pada kambing. Pada penelitian ini penggunaan *hMG* yang dikombinasikan dengan  $PGF_2\alpha$  rata-rata timbulnya birahi  $72,10 \pm 1,71$  pada sapi perah tidak menunjukkan perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol,  $p > 0,05$ .

Adanya respon ovarium akibat pemberian *hMG* pada pengamatan menunjukkan folikel dominan sejumlah banyaknya korpus luteum pada permukaan ovarium menunjukkan adanya perkembangan folikel sub ordinat menjadi dominan folikel. FSH - LH like yang terkandung di dalam *hMG* secara sinergis bekerja sama untuk saling menimbulkan aktivitas di ovarium yaitu menumbuhkan folikel dan ovulasi (Hunter, 1995). Setelah pengamatan folikel dominan dilanjutkan dengan mengamati jumlah folikel dominan sebelah kiri dan kanan baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan, folikel dominan yang dimaksud adalah folikel yang

berukuran diatas 8 mm yang sedang berkembang yang akan mengalami ovulasi terpantau saat pembedahan dilakukan pengukuran secara manual. Armstrong dkk (1982) menyatakan bahwa adanya folikel sisa menunjukkan fluktuasi perkembangan folikel yang tidak bersamaan atau mungkin ketidak mampuan LH untuk menimbulkan ovulasi. Pemberian hMG pada sapi perah pada penelitian ini menunjukkan respon yang sama pada perbedaan dosis yang diberikan ( $p > 0,05$ ), demikian pula jumlah folikel dominan sebelah kiri adalah  $(0,45 \pm 0,51)$  dan diperoleh jumlah folikel dominan sebelah kanan adalah  $1,0 \pm 0,0$ . Hal ini terjadi karena ovarium sebelah kanan lebih aktif dari ovarium sebelah kiri karena posisi anatomis ovarium sebelah kiri tertekan oleh rumen.

Beberapa jam setelah tanda-tanda estrus mulai terlihat, sapi perah diinseminasi buatan dengan semen beku.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa waktu timbulnya birahi ( $72.10 \pm 1,71$  jam ), tidak ada perbedaan baik pada kontrol (PMSG) maupun perlakuan (*hMG*), terdapat perkembangan ovarium dengan adanya sejumlah folikel Dominan ( $1,00 \pm 0,00$ ) pada ovarium sebelah kanan dan ( $0,45 \pm 0,51$ ) pada ovarium sebelah kiri setelah penyuntikan berbagai dosis hormon *hMG*.

#### 6.2. Saran

Untuk memperoleh hasil yang maksimal dalam penelitian ini perlu hewan coba yang lebih banyak sehingga dapat dianalisis dengan model statistik sehingga keragaman dosis *hMG* dapat diketahui.



## DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, R. Holmes, J. and Jacobs, H.S. (2000). *Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotrophin for ovarian stimulation in in vitro fertilization cycles : a metaanalysis. Fertil. Steril.*, 73, 338-343. [ISI] [Medline]
- Alvicar, A.A, R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984a. *Superovulatory responses in FSH or Pergonal-treated heifers. Theriogenology* 22:635.
- Alvicar, A.A, R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984b. *Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, progesterone and estradiol-17B in superovulated beef heifers. In: Proc. 10 th Int. Cong. Anim. Reprod. And AI, Vol. 3. p 303 Urbana II.*
- Alcivar. A.A, R.R Maurer and L.L Anderson 1992. *Endocrine changes in beef Heifers Supewrovulated with Follicle stimulating Hormone (FSH.P) or Human Menopausal Gonadotropin. Department of Animal Science Iowa State University and Roman Lhruskaus. Dept. of agriculture clay center. J. Anim Sci* 70:224-231.
- Anonimous.1994. *IIMS Manual for hMG. Pergonal Seruvo Singapore MIMS Asia.* 135. Cecil street.
- Arthur, G.H. 1993. *Veterinary Reproduction and Obstetrics The English Language Book Society and Balliere. Tindal London.*
- Asher, G.W., C. Scott, K.T. O'Neil, J.F. Smith, E.K. Inskeep and E.C. Townsend, 1997. *Ultrasonographic Monitoring of antral follicle development in red deer (Cervus elaphus). J. Reprod. Fert.*111:91-99.
- Bintara S. 1990. *Manipulasi Pola Gelombang Pertumbuhan Folikel Dengan Human Chorionic Gonadotropin pada Sapi Madura. Program Studi Ilmu Biologi Reproduksi. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya.*
- Critser, E. S., J. K. Critser, R.P. Winch, and C. Eilts. 1982. *Efficacy of Pergonal as a superovulatory drug in cattle. Theriogenology* 17:83.
- Daya, S., Gunby, J., Hughes, E.G. et al. (1995). *Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. Fertil. Steril.*, 64, 347-354. [ISI] [Medline].
- Daya, S and Gunby, J. (1999). *Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. Hum.Reprod.*, 14, 2207-2215. [Abstract/Free Full Text].

- Fricke, P.M., L.P. Reynolds and D.A. Redmer, 1993. *Effect of human chorionic gonadotrophin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows*. J. Anim. Sci. 71:1242-1246.
- Ginther, O.J., J.P. Kastelic and L. Knopf, 1989. *Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers*. Theriogenology 32:787-795.
- Giudice, F, Crisci, C., Eshkol, A. et al. (1994). *Composition of commercial gonadotropin preparations extracted from human post-menopausal urine : characterization of non-gonadotropin proteins*. Hum. Reprod., 9, 2291-2299. [Abstract].
- Gonzalez, A. J.G. Lussier, T. D. Carruthers, B.D. Murphy, and R.J. Mapletoft. 1990. *Superovulation of beef heifers with follitropin: a new FSH preparation containing reduced LH activity*. Theriogenology 33:519.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction In Farm Animal. Lea and Febiger*. Philadelphia. 98-99. 161 – 162. 392-404.
- Hardjopranjoto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press, Surabaya.
- Hariadi, M., and P.J. Wright, 1997. *The effect of oestradiol benzoate, HCG or aspiration of the dominant follicle on follicular wave and synchrony of PG-induced oestrus in cows*. Proc. 29th Annu Conf. Aust. Soc. Reprod. Biol. Adelaide.
- Hariadi. M, Samik. A, Hermadi HA, Srianto P. 2001. *Aplikasi Ultra Sonografi sebagai alat bantu di bidang reproduksi dalam kaitannya dengan peningkatan reproduktivitas ternak*. Riset Unggulan Terpadu (RUT) VII. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Hermadi HA, 2001. *Uji potensi Biologis Anti Bodi Poliklonal Anti Inhibin Pada Tikus Putih (Rattus Norvegicus)* Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 42 – 50.
- Hermadi HA, 2003. *Ujicoba PMSG Trans Ovari untuk Kasus Hypofungsi Ovarium Sapi Perah*. Hibah Bersaing 2003 Universitas Airlangga.
- Hinshelwood M.M., F. Kamel, D.J. Dierschke and E.R. Hauser. 1991. *Effect of charcoal extracts follicular fluid on reproductive function in post partum cows*. J. Endocrinology. 8 (1) : 37-54.
- Hung Yu Ng E. Estella Yee LL. William SBY and Pak Chung Ho 2000. *hMG is as good as recombinant human FSH in term of oocyte and embryo quality : a*

*prospective randomized trial* Dept. of obstetrics and gynaecology, Queen Mary hospital, the University of Hongkong.

- Imthurn, B., Macas, E., Rosselli, M. et al. (1996). *Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin*. *Hum. Reprod.*, 11, 2387-2391. [Abstract].
- Ismudiono, 1999. *Upaya Meningkatkan Angka Kebuntingan Melalui Inseminasi Dalam Upaya Penyerentakan Birahi Pada Sapi Perah*. Lembaga Penelitian UNAIR.
- Jacob, S., Drudy, L., Conroy, R. et al. (1998). *Outcome from consecutive in-vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone*. *Hum. Reprod.*, 13, 1783-1787. [Abstract].
- Lauria, A.A., A. Genazzani, O. Oliva, P. Inandi, F. Cremonesi, and C. Monitola. 1982a. *Clinical and endocrinological investigations on superovulation induced in heifers by human menopausal gonadotropin (HMG)*. *J. Reprod. Fertil.* 66:219.
- Lauria, A.A., A. Genazzani, O. Oliva, P. Inandi, F. Cremonesi, and C. M. Barbetti.. 1982b. *Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotropin (HMG)*. *Theriogenology* 18:357.
- Laura A. Genazzani AR, Olivia O, Inaudi P, Cremonesi F, Monittola C and Aureli G. 1982. *Clinical and endocrinological investigation on Superovulation induced in herfers by human menopausal gonadotropin*. *J. Reprod Fertil Sep 66 (1) : 219 – 25*.
- Madyawati, S.P., Ismudiono, P. Srianto, A. Samik dan T. Sadjito. 1994. *Waktu Timbulnya Birahi dan Angka Kebuntingan pada Sapi Perah yang diberi Hormon PMSG*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Malik A. 2000. *Efektivitas Prostaglandin (PGf2 $\alpha$ ) Intra Ovari Terhadap Penyerentakan Birahi Sapi Perah Friesian Holstain*. Thesis. Pasca Sarjana Universitas Airlangga.
- McGowan, M.R.M. Braithwaite. W. Jochle, and R.J. Mapletoft. 1985. *Superovulation of heifers with Pergonal (hMG) : a dose response trial*. *Theriogenology* 24. 24:173.
- Mercan, R., Mayer, J.F., Walker, D. et al. (1997). *Improved oocyte is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/*

- human menopausal gonadotrophin combination. Hum. Reprod.*, 12, 1886-1889. [Abstract].
- Moor, R.M., Th.A.M. Kruip. And D.Green. 1984. *Intraovarian Control of Folliculogenesis : Limits to Superovulation. Theriogenology* 18:33-34;
- Mustofa, I. E.D. Poetranto dan A. Wiyono. 1999. *Efektivitas Pemakaian PGf2 $\alpha$  Intrauterine Dibandingkan Cara Intramuskuler untuk Gertak Birahi pada Kambing (Data Belum Dipublikasikan).*
- Ratnani H dan Hermadi HA, 1992. *Pengaruh hMG Pergonal Sero no terhadap Birahi dan Kebuntingan pada Kambing.* Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Rogers, M., McLoughlin, J.D., Lambert, A. *et al.* (1995). *Variability in the immunoreactive and bioactive follicle stimulating hormone content of human urinary menopausal gonadotrophin preparation. Hum. Reprod.*, 10, 1982-1986. [Abstract]
- Samik. A, 1995, *Pemberian PGf2 $\alpha$  Dosis Tunggal Dan Dosis Ganda Intra Uterine Terhadap Daya Reproduktifitas Sapi Perah.* FH. Lemlit Unair.
- Skidmore, J.A., M. Billah and W.R. Allen, 1996. *The ovarian follicular wave pattern and induction of ovulation in the mated and non mated one-humped camel (Camelus dromedarius).* J. Reprod. Fert. 106:185-192.
- Srianto, P. 1995. *Profil Progesteron pada Induksi Kembar Dengan Menggunakan Hormon PMSG.* Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Steel, RGD dan JH Torrie. 1995. *Prinsip dan Prosedure Statistika Jakarta.* Penerbit PT. Gramedia Pustaka Jakarta.
- Sugano M, T. Shinogi, K Nakada and T Nakao, 2001. *Endocrine profiles and Embryo Quality in Japanese Black Cattle Superovulated with Human Menopausal Gonadotrophin and Porcine Follicle Stimulating Hormone. Fukushima Anamal Husbandry Fukushima and Japan Rakuno Gakuen University Ebetsu Hokkaido.* Reproduction in Domenstic Animals vol 36. p. 57.
- Suzuki O. Kaura M. Noguchi Y, Takano K. Yamamoto Y and Matsuda, 2003. *Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotropin in guinea pigs base on Follicular waves and FSH receptor homologies.* Dept. of veterinary science, National Institut of Infection Diseases Tokyo Japan. Mol. Repro Dev. Feb:64 (2) : 219-25.
- Teissier, M.P., Chable, H. Paulhac, S. *et al.* (1999). *Recombinant human follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin induction :*

- effect in mature follicle endocrinology. Hum. Reprod., 14, 2236-2241. [Abstract/Free Full Text].*
- Weissman, A., Meriono, J., Ward, S. *et al.* (1999). *Intracytoplasmic sperm injection after follicle stimulation with highly purified human follicle-stimulating hormone compared with human menopausal gonadotrophin. J. Assist. Reprod. Genet., 16, 63-68. [ISI] [Medline].*
- Westergaad L.G. 1999. *Monotropin LH Content and Assisted Reproduction Out Come. The First world congress on controversies in obstetrics. Gynecology and Infertility Prague, Czech Reprublik.*

## Lampiran 1

### 1. Laboratorium

No.	Nama Laboratorium	Jenis Pekerjaan	Kapasitas
1.	Fisiologi Reproduksi Kemajiran FKH UA	Test Sperma IB	Memadai
2.	Laboratorium KebidananFKH UA	Sephadex G 50	Memadai
3.	Persh. Susu Frans	Hewan Coba Sapi Perah	Memadai

### Peralatan Utama yang Tersedia

No.	Nama Alat	Lokasi	Kegunaan	Kapasitas
1.	Microscope Stereo Disecting	Lab. Fisiologi Rep. FKHUA	Evaluasi Sperma	Memadai
2.	USG	Lab. Kemajiran FKHUA	Pantauan USG	Memadai
3.	Sephadex G 50	Laboratorium Kebidanan	Evaluasi hMG	Memadai

### Peralatan Utama

Nama	Kegunaan	Kemampuan
USG	Deteksi ovarium	100 %
Elektroforesis	Karakterisasi protein	100 %
Kromatografi	Separasi protein	100 %
Laminar flow	Prosesing Hormon	100 %
Mikroskop Inverted	Pengamatan sperma	100 %
Ultrasentrifuse	Fraksinasi protein	100 %
Frezer - 20°C, -90°C	Penyimpanan material penelitian	100 %
AI Kit	Inseminasi Buatan	100%
Blowing Pump	Penguap cairan urine	100 %

## LAMPIRAN 2

## PERHITUNGAN SPSS ANOVA

Case Processing Summary<sup>a</sup>

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
BIRAH I * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
OVARKA * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%
OVARKI * PERLAKUAN	20	100.0%	0	.0%	20	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries<sup>a</sup>

			BIRAH I	OVARKA	OVARKI
PERLAKUAN	P0	1	70.00	1.00	1.00
		2	72.00	1.00	.00
		3	73.00	1.00	.00
		4	72.00	1.00	1.00
		5	74.00	1.00	.00
	Total	N	5	5	5
		Sum	361.00	5.00	2.00
		Mean	72.2000	1.0000	.4000
		Std. Deviation	1.48324	.00000	.54772
	P1	1	69.00	1.00	.00
		2	72.00	1.00	.00
		3	73.00	1.00	1.00
		4	74.00	1.00	1.00
5		75.00	1.00	.00	
Total	N	5	5	5	
	Sum	363.00	5.00	2.00	
	Mean	72.6000	1.0000	.4000	
	Std. Deviation	2.30217	.00000	.54772	
P2	1	70.00	1.00	1.00	
	2	73.00	1.00	.00	
	3	72.00	1.00	.00	
	4	73.00	1.00	1.00	

	5		69.00	1.00	.00
	Total	N	5	5	5
		Sum	357.00	5.00	2.00
		Mean	71.4000	1.0000	.4000
		Std. Deviation	1.81659	.00000	.54772
P3	1		72.00	1.00	1.00
	2		73.00	1.00	1.00
	3		72.00	1.00	1.00
	4		74.00	1.00	.00
	5		70.00	1.00	.00
	Total	N	5	5	5
		Sum	361.00	5.00	3.00
		Mean	72.2000	1.0000	.6000
		Std. Deviation	1.48324	.00000	.54772
Total	N		20	20	20
	Sum		1442.00	20.00	9.00
	Mean		72.1000	1.0000	.4500
	Std. Deviation		1.71372	.00000	.51042

a. Limited to first 100 cases.

ANOVA

BIRAH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.800	3	1.267	.390	.762
Within Groups	52.000	16	3.250		
Total	55.800	19			

ANOVA

OVARKA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000		
Within Groups	.000	16	.000		
Total	.000	19			



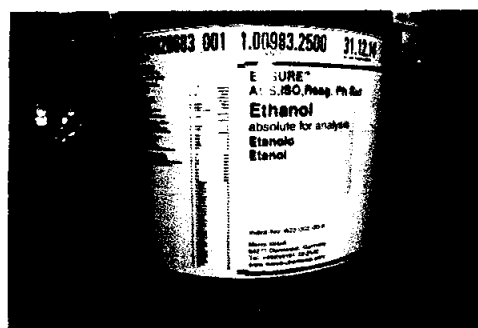
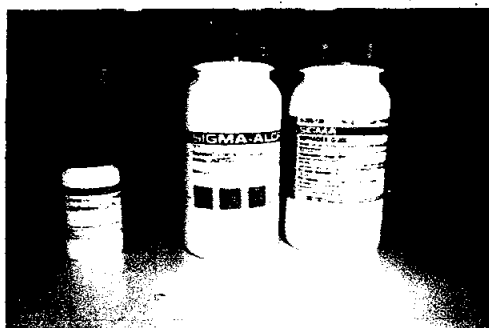
## ANOVA

OVARKI

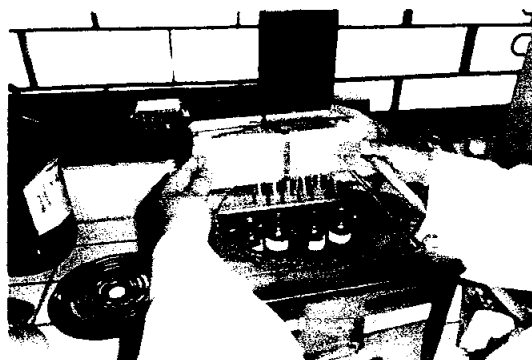
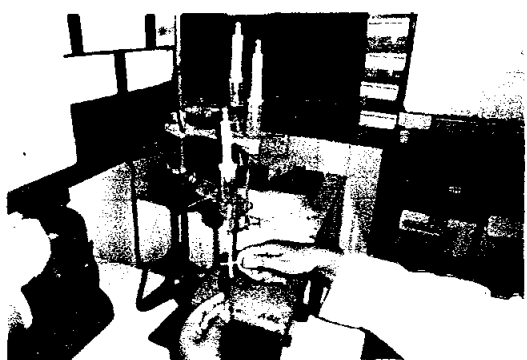
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.150	3	.050	.167	.917
Within Groups	4.800	16	.300		
Total	4.950	19			



Gambar .1. Koleksi Urine dari wanita menopause



Gambar 2. Bahan etanol absolut untuk ekstraksi dan bahan sephadex G100



Gambar 3. Teknik penggunaan coloum sephadex dan blowing evaporation



Gambar 4. Produk Freeze dry hMG



Gambar 5. Cara penggunaan USG Transrectal