

BAB II

LATAR BELAKANG PERMASALAHAN, TUJUAN PENELITIAN DAN HYPOTESIS.

Latar Belakang Permasalahan

1. Secara umum dapat dijabarkan bahwa kerana terbatasnya sarana dan prasarana pada permulaan dibanggunnya Laboratorium Ilmu Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, mengakibatkan pada semester pertama 1984 belum dapat dilakukan uji hormon. Hal ini diakibatkan oleh tidak didupatkannya sama sekali alat alat utama atau penyokong untuk dapat dioperasikannya suatu assay baik untuk analisa kualitatif lebih lebih untuk analisa kuantitatif. Pemeriksaan hormon secara kuantitatif memerlukan laboratorium yang siap pakai untuk tujuan tertentu yang tidak bisa dicampur dengan kegiatan laboratorium yang lain seperti laborotorium untuk aplikasi isotop. Demikian pula alat penera seperti Liquid Scintillation counter untuk RIA fase cair atau Gamma counter untuk RIA fase padat serta alat alat pendukungnya memerlukan biaya yang besar dan kemampuan yang tinggi. Demikian pula perangkat keras dan pendukung yang diperlukan untuk pengembangan Enzyme Immunoassay (EIA) baik secara kualitatif lebih lebih secara kuantitatif untuk hormon progesteron sama sama juga belum dapat dikembangkan pada saat itu di Laboratorium Kebidanan Veteriner. Bertitik

tolak akan penggunaan isotop pada teknik RIA, disamping harus dipikirkan mengenai penyimpanan sampah radioaktifnya juga tidak kalah pentingnya harus dipikirkan perlengkapan pengaman kerja, dosimeter, minimonitor untuk mengetahui adanya kontaminasi radioaktif pada salah satu bagian tubuh ataupun pada perlengkapan kerja. Memilih macam radioaktif yang digunakan dalam suatu uji hormon harus juga dipertimbangkan akan bahaya kontaminasinya (Personal contamination hazard) oleh jenis radioaktif tertentu. Walaupun daya radiasi dari beberapa jenis radioaktif berbeda, tetapi pada umumnya radioaktif mempunyai urutan kepekaan di dalam tubuh dari peka sekali hingga kurang peka yaitu: 1. Kelenjar gonad 2. Sumsum tulang 3. Darah dan 4. Kulit. Dilain pihak telah diketahui bahwa isotop yang memancarkan sinar gamma $^{125}_{54}\text{I}$ $^{131}_{53}\text{I}$ mempunyai radiasi yang lebih kuat dari radionucleotida yang memancarkan sinar beta (^3H). Sehingga pemilihan satu isotop pada suatu assay berlandaskan pada suatu keuntungan, efisiensi, mudah didapat sesuai dengan kemampuan perangkat keras dan perangkat lunak yang dimiliki. Untuk dapat mendekati permasalahan ini, agar proyek penelitian peneraan kadar hormon dapat dilakukan, maka isotop $^{125}_{54}\text{I}$ merupakan pilihan untuk diterapkan pada laboratorium yang baru dibangun dengan fasilitas yang masih sedang dikembangkan. Pilihan ini didasarkan pada waktu paruh (half life) $^{125}_{54}\text{I}$ selama 60 hari, efisiensi radioaktifnya 80% daya radiasinya lebih lemah daripada $^{131}_{53}\text{I}$. Disamping itu ada

beberapa kekurangan yang lain dari ^{131}I yaitu: waktu paruhnya hanya 8 hari, efisiensi radioaktifnya 27%, sinar radiasinya dapat lebih menembus jaringan. Sedangkan dilain pihak pemakaian ^3H dalam teknik RIA fase cair, walaupun memancarkan sinar beta yang tergolong sinar radioaktif lebih lemah dari sinar gamma, dan juga waktu paruhnya lebih lama dari ^{125}I ataupun ^{131}I , tetapi efisiensi deteksi radioaktifnya hanya 55%. Selain itu pemakaian tritium dalam RIA fase cair menghasilkan limbah radioaktif jauh lebih banyak, iritasi dan mudah terbakar. Dengan terungkapnya analisis hormon dengan memanfaatkan jasa radioisotop yang pertama kali diperkenalkan oleh Berson dan Yalow (1969), mengakibatkan penentuan kasus kasus reproduksi yang sebelumnya hanya dilakukan dan ditetapkan dengan melihat gejala klinis dan sistem rekording kini diharapkan dapat didiagnosa lebih cermat.

Walaupun baru diperkenalkan sekitar 17 tahun yang lalu teknik EIA ini, (Engvall dan Parlmann, 1972) tetapi telah dapat menyaingi teknik RIA dalam hal kepekaan yang dimiliki hampir sama dalam penentuan kadar hormon (Voller dkk., 1979). Tetapi teknik EIA ini lebih banyak memakan waktu, menggunakan alat yang lebih mahal dan ikatan antibodi-antigen-antigen-berlabel lebih labil daripada RIA dalam penentuan hormon progesteron. Maka teknik RIA walaupun ada bahaya radiasi yang sangat kecil tetap merupakan pilihan di laboratorium yang baru dibangun dengan serba kekurangannya.

2. Penalaran Permasalahan Penelitian

Cara uji hormon dengan menerapkan teknik RIA merupakan salah satu cara idendifikasi hormon secara kuantitatif dengan sensitivitas yang cukup tinggi (nanogram atau picogram). Dari beberapa teknik pengujian hormon yang diketahui, maka RIA fase padat merupakan salah satu teknik peneraan hormon yang memakai ^{125}I sebagai label hormon (tracer atau radioligand). Pada pemeriksaan hormon steroid seperti progesteron, selain diperlukan anti hormon progesteron spesifik juga diperlukan progesteron bertanda dengan ^{125}I ($^{125}\text{I-P4}$). Pembuatan anti hormon ini diperlukan teknik khusus sebab hormon progesteron mempunyai berat molekul rendah sehingga dia bukan senyawa hormon yang immunogenik. Walaupun demikian hal ini dapat dibuat dengan cara mengaitkan protein yang mempunyai berat molekul besar seperti albumin serum sapi atau Bovine serum albumin (BSA) pada molekul progesteron. Ikatan itu terjadi masing masing pada unsur carboxyl atau pada amino yang dimiliki baik oleh progesteron ataupun BSA sehingga akhirnya terbentuk suatu senyawa Steroid-protein yang siap dipakai sebagai perangsang timbulnya anti bodi spesifik yang immunogenik. Tetapi tidak demikian halnya dengan hormon glycoprotein seperti FSH dan LH. Hormon ini mempunyai berat molekul sekitar 30.000 sehingga dari ukuran molekul dan struktur kimiawinya hormon ini adalah immunogenik. Akibatnya hormon ini dapat langsung dipakai sebagai antigen,

disuntikan dibawah kulit selama 1 minggu pada hewan coba untuk menghasilkan antibodi . Kepekaan dan kekhasan suatu assay hormon akan sangat ditentukan oleh kemurnian anti hormon yang dihasilkan (Anonimus, 1984; Chard, 1982).

Untuk membuat hormon steroid bertanda dengan ¹²⁵I juga diperlukan proses yang lebih panjang yaitu harus diberikan jambatan penghubung hemisuccinate atau glucoronide terlebih dahulu antara steroid dengan ¹²⁵I. Sedangkan membuat LH bertanda dengan ¹²⁵I langsung dapat dilakukan dengan perantaraan oxydant Cloramine-T. Kemudian setelah pemisahan antara molekul yang berikatan dengan tracer dan hormon bebas lewat sephadex G-25 maka akan didapat ikatan ¹²⁵I-LH (Lengemann dan Reimers, 1982; Chard, 1982; Anonimus, 1984).

Dengan adanya kit progesteron yang dapat dipakai untuk analisis kadar progesteron untuk hewan dan manusia tentunya dengan menentukan masing masing tingkat validitas assay, maka satu segi penerapan teknik RIA ini diharapkan dapat memantau status reproduksi ini lebih cepat. Tetapi berbeda dengan pemakaian kit hormon glycoprotein, dimana kit untuk manusia tidak bisa dipakai untuk masing masing hewan, sehingga untuk pemeriksaan hormon glycoprotein pada jenis hewan tertentu harus dilakukan pembuatan antibodi dan hormon bertanda yang berasal dari hewanya sendiri.

3. Permasalahan Secara Khusus

3.1. Teknik radioimmunoassay yang menggunakan jasa aktifitas

radioisotop untuk menera kadar hormon secara kuantitatif harus dipertimbangkan akan efisiensi kerja, efisiensi radiasi yang terhitung, waktu paruh, limbah radioisotop. Kemudian harus dipertimbangkan juga jenis radioisotop yang lebih aman untuk pekerja, merupakan suatu keharusan yang tidak dapat dihindarkan dalam aplikasi RIA. Teknik RIA fase padat yang memakai radioaktif ^{125}I sebagai label mempunyai beberapa kelebihan baik terhadap ^{131}I ataupun terhadap tritium (^3H). Walaupun ada sedikit kelemahannya, ^{125}I rupanya tetap merupakan pilihan baik untuk melabel hormon steroid ataupun glycoprotein yang secara luas dipakai dalam assay hormon oleh para peneliti di seluruh dunia .

3.2. Pemantauan secara klinis dan pemanfaatan sistim pencatatan (recording) menunjukkan bahwa banyak dijumpai sapi yang tidak dapat mencapai target tujuan reproduktifitas satu anak dalam satu tahun. Hal ini disebabkan oleh adanya anoestrus, birahi tenang, kebuntingan dini yang tak terdiagnosa, kematian embrio dini sehingga sapi tetap dalam keadaan anoestrus merupakan suatu tantangan yang perlu pemecahannya. Dengan memperhatikan adanya hormon progesteron yang berfluktuasi dengan kadar yang bervariasi antara masing masing fase birahi dan juga pada tiap fase reproduksi diharapkan pemantauan status reproduksi dapat ditentukan lebih tepat.

3.3. Banyak dijumpai kasus pada sapi Friesian setelah di IB dalam beberapa bulan atau setahun berikutnya tidak menunjukkan gejala kebuntingan sedangkan birahinya tidak kembali. Dengan menganalisis kadar hormon progesteron pada 22 hari hingga 29 hari setelah IB diharapkan dapat mendiagnosa sapi dalam keadaan bunting dini, sehingga kasus IB dalam keadaan bunting dini dapat dihindarkan.

3.4. Dilain pihak juga banyak sapi sapi di IB bukan pada saatnya yang tepat, yaitu dalam arti IB dilakukan pada fase luteal. Sehingga akibatnya kebuntingan yang diharapkan jauh lebih rendah dibandingkan IB dilakukan pada fase folikuler. Pengambilan sampel dan analisis kadar progesteronya pada saat dilaksanakan IB (hari 0) diharapkan dapat membantu menentukan birahi lebih tepat.

3.5. Birahi tenang ataupun anoestrus banyak dijumpai pada sapi sapi dengan kondisi yang kurang baik ataupun setelah beberapa minggu pasca-lahir. Tetapi dilain pihak anoestrus ataupun birahi tenang juga banyak dijumpai pada sapi dengan kondisi badan yang baik. Di luar faktor kendali genetik, disini masih dicoba dengan pemberian hormon steroid, hormon glycoprotein serta PGF_{2alpha} analogue. Apakah pada sapi pasca-lahir terjadi gangguan keseimbangan kadar hormon steroid

ataupun glycoprotein pada sapi sapi pasca-lahir atau yang mengalami hypofungsi ovarium. Penggunaan obat-obatan seperti progesteron yang disuntikan, progesteron intravaginal, MPA, HCG, GnRH dan PGF₂ apakah dapat memberikan jawaban dalam

memperbaiki siklus birahi dan reproduktifitas. Tetapi laporan dari banyak peneliti menyebutkan bahwa penggunaan obat-obatan tersebut diatas memberikan hasil yang berbeda-beda sehingga timbul kesan bahwa kemaknaan obat tersebut belum menentu.

3.6. Penggunaan progesterone releasing intravaginal device (PRID) ataupun chronolone spon intravaginal pada kasus anoestrus dilaporkan dapat memberikan hasil, tetapi angka konsepsinya tidak melebihi 50%. Penyisipan Medroxy progesterone acetate (MPA) yang semula dipakai sebagai antifertilitas pada ibu-ibu fertil, dengan mengadakan perubahan rute dan cara pemberiannya, diduga keras dapat membantu menimbulkan birahi dan ovulasi pada sapi sapi anoestrus.

Karena keseimbangan hormon reproduksi sangat rendah pasca-lahir maka penyuntikan GnRH dosis rendah satu kali langsung ke dalam vena yugularis, diharapkan dapat memberikan respon meningkatnya LH darah perifer serta diikuti oleh birahi dan ovulasi.

3.7. Berbagai macam sampel telah dicoba diambil untuk menentukan kadar progesteron dalam cairan tubuh dan satu sama lain melaporkan keunggulan dan kejelekannya. Apakah setiap sampel cairan tubuh mengandung kadar progesteron yang sama atau mendekati satu sama lain, perlu dianalisa lebih cermat.

Tujuan Penelitian

1. Mengembangkan dan menerapkan teknik radioimmunoassay fase padat untuk progesterone air susu dengan kit dan untuk LH dalam serum darah dengan melabel sendiri hormonnya dengan 125 I guna memantau dan menentukan status reproduksi pada sapi perah pasca-lahir.
2. Mendiagnosa kebuntingan dini (24 hari), kematian embrio dini yang selama ini belum dapat terdiagnosa oleh teknik lain.
3. Menentukan kecermatan deteksi birahi dengan waktu diadakan IB lewat kadar progesteron air susunya, karena diduga banyak sapi sapi di IB tidak pada waktu saat birahi.
4. Menentukan efektifitas obat-obatan seperti MPA-spon, PRID, GnRH, HCG dan PGF_{2alpha} terhadap timbulnya birahi, ovulasi dan angka konsepsinya.
5. Untuk mendapatkan jawaban, apakah sapi sapi yang mengalami anoestrus dini pasca-lahir disebabkan oleh rendahnya salah satu kadar hormon progesteron, LH ataupun

kedua hormon tersebut, sehingga dapat diambil tindakan pemecahannya secepatnya.

6. Untuk mengetahui respon hypofisa anterior dan aktifitas ovarium pada sapi perah pasca-lahir dini terhadap obat GnRH yang diberikan.

7. Untuk mendapat informasi yang lebih cermat tentang hubungan dan perbedaan kadar progesteron pada air susu penuh, air susu skim, plasma dan serum darah.

Berdasarkan ke tujuh butir tujuan yang disebutkan di atas diharapkan dengan hasil penelitian ini dapat memberikan petunjuk untuk mengadakan tindakan yang lebih dini pada bagi peternak terhadap sapi yang sedang bunting dini (24 hari), dan tindakan terhadap sapi yang mengalami anoestrus dengan pemberian obat-obatan yang sesuai dengan indikasinya.

Hypotesa Penelitian

1. Tidak terdapat perbedaan fluktuasi kadar hormon progesteron yang mencerminkan birahi pertama, ovulasi pertama, saat konsepsi, jumlah sapi yang mengalami anoestrus dan panjang daur birahi pertama dengan daur kedua pasca-lahir diantara masing masing daerah peternakan.

2. Tidak terdapat perbedaan kadar hormon progesteron pada sapi yang menjadi bunting, tidak bunting dan yang mengalami kematian embrio dini pada periode waktu IB (hari 0), hari ke 22, dan hari ke 29 dari IB.
3. Tidak terdapat perbedaan respon timbulnya birahi, ovulasi dan kebuntingan pada kelompok sapi sapi anoestrus yang diobati dengan PRID, MPA, GnRH. Demikian pula adanya perbedaan respon birahi, ovulasi dan kebuntingan pada sapi yang diobati dengan PGF_{2alpha}.
4. Tidak terdapat perbedaan kadar progesteron serta terjadi hubungan yang erat diantara masing masing cairan tubuh seperti air susu penuh (whole milk), susu bawah (skim), plasma dan serum darah.
5. Tidak terdapat perbedaan dan terjadi hubungan yang kuat pada kadar progesteron dan LH pada masing masing periode pasca-lahir.
6. Tidak ada hubungan positif antara waktu dengan kadar LH setelah penyuntikan GnRH.
7. Tidak terdapat perbedaan kadar progesteron di dalam masing masing cairan tubuh.