

BAB III

MATERI DAN METODA

1. Variabel yang diteliti berupa :

- a. Kadar progesteron dalam air susu penuh (Whole milk), susu skim, plasma dan serum darah.
- b. Timbulnya birahi pertama pasca-lahir
- c. Ovulasi
- d. Anoestrus
- e. Birahi tenang
- f. Panjangnya daur birahi I dan II pasca-lahir
- g. Kebuntingan
- h. Kematian anak dini
- i. Inseminasi buatan pada waktu fase luteal
- j. Inseminasi buatan pada fase folikuler
- k. Kadar progesteron dan LH pada kurun waktu 5, 10, 21 dan 42 hari pasca-lahir
- l. Puncak kadar LH setelah dirangsang dengan gonadotropin releasing hormon (GnRH).
- m. Kadar hormon progesteron selama 10 hari setelah GnRH.

Tabel I. Jenis Percobaan dan Masing-masing Tujuan Percobaan Yang Dipakai Dalam Penelitian.

Jenis Percobaan	n/sampel*	T u j u a n
I. 1.	168*	Untuk mengetahui perbedaan kadar progesteron dalam air susu penuh, skim, serum dan plasma darah .
2.	30*	Untuk menentukan batas kadar progesteron pada fase folikel, fase luteal dan bunting.
II	90	Untuk menentukan jenis status reproduksi pada peternakan sistem perusahaan (Surabaya) dengan peternakan kecil (Grati). Demikian pula perbedaan pluriparus (Grati) dengan premiparus (Puspo).
III.	120	Untuk mengetahui adanya kejadian IB pada fase luteal, kematian dini dan diagnosa tidak bunting.
IV. 1.	30	Untuk menentukan efektifitas obat-obatan PGFim, PGFiu dan HCG pada penderita kista CL dan kista folikel
2.	50	Untuk mengetahui efektifitas obat-obatan derivat progesteron dan GnRH pada penderita hypofungsi ovarium.
V.	10	Untuk mengetahui hubungan waktu pasca-lahir dengan kadar progesteron dan LH.
VI.	5	Untuk menguji hypothalomo-hypofisa-ovarium, dalam hubungan waktu penyuntikkan GnRH dengan respon LH.

2. Hewan coba dan rancangan percobaan

2.1. Percobaan I:

Percobaan I.1 (Rancangan acak lengkap)

Sebanyak 168 sampel dari 4 jenis sampel yang berbeda dengan anggota masing masing 42 sampel dari 5 ekor sapi, dikumpulkan selama 21 minggu dari berbagai fase daur birahi.

Percobaan I.2 (Rancangan acak kelompok)

Masing masing 10 sampel air susu diambil secara acak pada saat IB yang teraba adanya folikel lewat palpasi rektal, 10 sampel pada saat fase luteal (7 hari setelah IB) dengan teraba adanya korpus luteum. Sedangkan 10 sampel lagi dikumpulkan pada 22 hari setelah IB pada sapi yang menjadi bunting.

2.2. Percobaan II (Rancangan acak kelompok)

Dalam rancangan ini terdiri dari 90 ekor sapi betina Friesian, dan dibagi menjadi 3 subkelompok daerah peternakan berdasarkan tujuannya.

2.2.1. 30 ekor sapi Friesian betina lokal telah pernah melahirkan 2 hingga 4 kali di daerah peternakan sapi perah di Kodya Surabaya. Ketinggian daerah 4-5 meter diatas permukaan laut, dan sapi sapi tersebut dipilih secara acak dari 5 perusahaan sapi perah yang memiliki 35 hingga 95 ekor sapi perah. Pakan

sapi tersebut hampir sama secara kuantitas dan kualitas setiap harinya dari ke 5 perusahaan sapi perah yang ada di Surabaya. Pakan tersebut antara lain: ampas tahu 4 kg/ekor, dedak 4 kg/ekor, pelet konsentrat 1 kg/ekor yang dibrikan 2 kali sehari pada saat pemerahan susu (03,00 dan 10,00). Mineral secara khusus tidak diberikan, serta rumput lapangan diberikan 30-35 kg/ekor/hari (jam 16,00-18,00). Kondisi badan rata rata di daerah peternakan ini terkesan baik dengan skor 3 (Mulvany, 1977).

2.2.2. 30 ekor sapi betina Friesian lokal yang telah melahirkan 2 hingga 4 kali di daerah peternakan sapi perah Grati (Pasuruan). Ketinggian daerah 5-7 meter diatas permukaan laut, dan sapi sapi tersebut didapat dari 7 orang pemilik sapi perah yang memiliki 5-15 ekor sapi perah. Waktu pemberian konsentrat hampir sama untuk seluruh peternakan di Grati yaitu, saat pemerahan susu (04,00 dan 11,00). Pakan untuk daerah peternakan kecil ini juga secara kuantitatif dan kualitatif hampir sama yaitu, berupa dedak 3 kg/ekor yang ditambah sedikit garam dapur, pelet konsentrat 1/2 kg/ekor. Tambahan mineral tidak diberikan, sedangkan rumput lapangan yang dicampur dengan rumput gajah dan daun kacang kacangan (Leguminaceae) serta jerami padi diberikan

kuarang lebih 30-40 kg/ekor/hari (jam 16,00). Kondisi badan tampak kurang baik yaitu, rata rata dengan skor 2 (Mulvany, 1977)

2.2.3. 30 ekor sapi Friesian betina milik 10 petani sapi perah yang mempunyai antara 3 hingga 5 sapi perah, dan beranak baru satu kali, di daerah peternakan Puspo (Pasuruan). Ketinggian daerah antara 625 hingga 650 meter diatas permukaan laut. Sapi tersebut lahir dan dimasukkan dari New Zealand. Pakan tambahan berupa dedak 3-4 kg/ekor dengan sedikit garam dapur dicampur dengan air diberikan waktu pemerahan susu (04,00 dan 10,00). Pelet konsentrat sangat jarang hingga tidak diberikan sama sekali. Rumput lapangan yang dicampur kadang kadang dengan rumput gajah, jerami padi, daun kacang kacangan dan daun serta batang jagung, yang diberikan dengan perkiraan 30-40 kg/ekor (jam 17,00). Kondisi badan tampak dengan kesan kurang baik dengan skor rata rata 2 (Mulvany, 1977).

2.3. Percobaan III (Rancangan Acak lengkap)

Dalam rancangan ini dipergunakan 120 ekor sapi Friesian betina, untuk menguatkan sapi dikawinkan dalam keadaan birahi, penentuan kebuntingan dini dan kematian embrio dini. Sapi sapi tersebut dilaporkan dalam keadaan

birahi dan di IB oleh inseminator dari 5 perusahaan sapi perah Friesian di Surabaya.

2.4. Percobaan IV (Rancangan praeksperimental one group pretest-posttest design) (Anonimus, 1984c). Terdiri dari 80 ekor sapi Friesian betina, 60 hingga 110 hari anoestrus pasca lahir yang disebut dengan kelompok IV. Kelompok ini dibagi menjadi 2 sub kelompok menurut struktural patologi yang ditemukan didalam ovariumnya :

2.4.1. Kelompok ini terdiri dari 30 ekor sapi betina anoestrus, serta didalam ovariumnya ditemukan kista ovari antara lain : kista korpus luteum atau korpus luteum persisten dan kista folikuler . Lalu sub-kelompok ini di bagi menjadi 3 cara pemberian obat dan menurut klasifikasi struktur patologinya. Untuk membedakan kista korpus luteum atau korpus luteum persisten, dimana dengan perabaan secara rektal ditemukan adanya penonjolan di permukaan ovarium dengan puncaknya teraba kasar dan konsistensinya agak memadat. Pada kista CL disertai dengan adanya konsistensi yang tegang pada bagian bawah CL yang berada didalam ovarium. Sedangkan kista ovarium atau kista folikel, sama sama teraba adanya penonjolan di permukaan ovarium, tetapi penonjolannya sifatnya tidak kasar, bahkan berfluktuasi.

2.4.1.1. 10 ekor sapi Friesian disuntik dengan 25 mg dynoprost (Lutalyse, Upjohn) secara intramuskuler (im) gluteus .

2.4.1.2. 10 ekor sapi Friesian anoestrus di deposisikan (PGF2 alfa analoge) 5 mg Dynoprst (lutalyse, Upjohn), didalam rongga kornua uterus yang satu sisi dengan struktural patologi yang ada dalam ovariumnya.

2.4.1.3. 10 ekor sapi Friesian anoestrus disuntikkan secara secara intra muskuler sebanyak 3000 iu Human chorionic gonadotropin (HCG) (Pregnyl, Organon).

2.4.2. Sub-kelompok ini terdiri dari 50 ekor sapi Friesian anoestrus akibat tidak adanya struktural fungsional di dalam ovariumnya (hypofungsi). Perabaan secara rektal untuk mendapatkan kasus ini dapat dilakukan dengan meraba adanya ovarium relatif kecil, permukaannya halus serta tidak ada bentukan aktif berupa CL atau folikel dipermukaan ovariumnya. Kemudian sub-kelompok ini dibagi menjadi 5 kelompok jenis pengobatan.

2.4.2.1. 10 ekor sapi anoestrus diberikan masing masing dengan spon berbentuk silender berukuran 3 x 6 cm. Dengan perantara 1 ml aquadest 300.000 iu penicillin (Procaine penicillin G, Hoechst) lalu diserap kedalam spon tersebut. Tiga puluh cm snar plastik dikaitkan dengan spon untuk memudahkan untuk waktu penarikan kembali, lalu diselipkan didalam vagina anterior selama 10 hari dengan bantuan vaginoscope berlampu (Varta 618).

2.4.2.2. 10 ekor sapi Friesian anoestrus, masing-masing diberikan 150 mg Medroxy Progesterone acetate (MPA)(Depo-provera, Upjohn) dan 300.000 iu penicilline (Procaine penicillin G, Hoechst). Obat obat ini diserap ke dalam spon silinder berukuran 3 x 6 cm dengan 30 cm plastik snar sebagai penghubung lalu deselipkan ke dalam vagina anterior selama 10 hari dengan perantaraan vaginoscope berlampu (Varta 618)(gambar 29 dan 30) .

2.4.2.3. 10 ekor sapi Friesian anoestrus diberikan masing masing secara intra vaginal dengan progesterone realeasing intravaginal device (PRID, ABBOTT) yang mengandung 1,55 g progesteron di dalam karet-silikon dan 10 mg estrdiol benzoat dalam kapsul gelatin. PRID ini dimasukkan kedalam vagina anterior memakai kayu selinder (2,5 x 40 cm). Setelah didalam vagina selama 10 hari, PRID dicabut dengan menarik tali yang berada menggantung di luar vulva (gambar 31 dan 32).

2.4.2.4. Sub kelompok pengobatan ini juga terdiri dari dari 10 ekor sapi anoestrus yang diberikan masing masing progesteron releasing intra vaginal device (PRID, ABBOTT) selama 10 hari, dan waktu pemeriksaan

kembali disuntik secara intra muskuler dengan 25 mg LH (Burn Biotec. Laboratories).

2.4.2.5. 10 ekor sapi Friesian anoestrus disuntikkan intra muskuler gluteus dengan total dosis 450 ug GnRH (Gonadorelin, Hoechst) yang di bagi dalam 3 dosis berturut turut selama 3 hari.

2.5. Percobaan V (Rancangan korelasional) (Anonimus, 1984c).

Kelompok ini dirancang untuk mendapatkan hubungan antara kadar progesteron (P4) dan Luteinizing hormon (LH) dalam waktu 5, 10, 21 dan 42 hari pasca lahir. Kelompok ini terdiri dari 10 ekor sapi pasca lahir yang didapat dari sekelompok sapi di Kodya Surabaya.

2.6. Percobaan VI (Rancangan praeksperimental, group pretest posttest design)(Anonimus, 1984c). Rancangan ini dimaksudkan untuk mengetahui adanya respon LH sebelum dan sesudah penyuntikan GnRH, dan daya ovulasinya. Kelompok ini terdiri dari 5 ekor sapi anoestrus 21 hari pasca lahir, lalu diberikan 200 ug GnRH (Gonadorelin, Hoechst) secara intravena yugularis. Progesteron diikuti 10 hari setelah penyuntikan GnRH dengan interval 2 kali seminggu.

3. Pengambilan sampel air susu

Untuk analisa kadar progesteron 10 ml air susu diambil setelah pemerahaan pagi (10.30) langsung dari puting kedalam

tabung gelas bertutup karet diteterasi sebelumnya dengan 2 tetes 11% kalium dichromate sebagai pengawet. Kecuali untuk pemeriksaan progesteron dalam susu penuh, maka semua air susu diputar dalam centrifuge 1000 xg selama 15 menit, lalu krim yang berada dipermukaan tabung diisap dengan mesin pengisap (suction pump). Sedangkan skimnya disimpan dalam suhu kering beku -18°C sampai assay kemudian dilakukan.

Pada percobaan I.1. Selain 10 ml air susu penuh dan skim dikumpulkan, juga diambil 10 ml darah dari vena yugularis yang ditampung didalam 10 ml tabung gelas hampa udara (venoject) dengan perantaraan jarum 17G yang memakai needle holder. Kemudian darah segera dibagi 2 sama banyak kedalam tabung venoject yang berisi heparin dan satu bagian yang lain tetap pada tabung yang dipakai untuk pengambilan darah dari vena yugularis. Darah yang dicampur dengan heparin diputar 1000 x g selama 15 menit untuk mendapatkan plasma. Sedangkan darah tanpa heparin serumnya baru diambil setelah dibiarkan pada suhu kamar selama 3 jam dengan kemiringan 45° dan dengan tusukan pada permukaan darahnya.

Untuk percobaan I.2. Tiga jenis sampel air susu masing masing berasal dari fase folikuler (teraba adanya folikel) , fase luteal (7 hari setelah IB) dengan teraba adanya korpus luteum dan 22 hari setelah IB serta menjadi bunting. Tiap tiap jenis sampel ini terdiri dari 10 sampel, sehingga terkumpul semuanya 30 sampel.

Pada percobaan II, Dua puluh dari 30 ekor sapi tersebut sampel air susunya mulai diambil saat 14 hari pasca-lahir, sedangkan 10 ekor lainnya diambil saat 5 hari hingga 80 hari pasca-lahir dengan interval 2 kali seminggu.

Pada percobaan III. Pengumpulan sampel air susu dimulai pada saat dilakukan Inseminasi Buatan (IB= hari 0) kemudian dilanjutkan 22 hari dan 29 hari setelah IB.

Percobaan IV. Sampel air susu diambil 7 hari sebelum pengobatan hingga 42 hari setelah pengobatan 2 kali seminggu.

Untuk percobaan V. Air susu diambil sejak 5 hari pasca lahir hingga 80 hari pasca-lahir 2 kali seminggu dan bersamaan pula diambil serum darahnya untuk pemeriksaan kadar LH.

Untuk percobaan VI. Air susu juga diambil hanya 4 kali yaitu, pada saat sebelum penyuntikan GnRH, 4 hari, 7 hari dan 10 hari setelah penyuntikan GnRH.

4. Pengumpulan sampel untuk analisis kadar LH.

Pada percobaan V, 3 ml darah yang diambil dengan perantaran jarum 17G terkait dengan needle holder kemudian tabung gelas hampa udara bertutup karet dipakai untuk menyedot darah dari vena yugularis.

Pada percobaan VI, sampel darah diambil dengan memasukkan kanula (polypropylene) berpenampang tengah 1 mm sepanjang 5

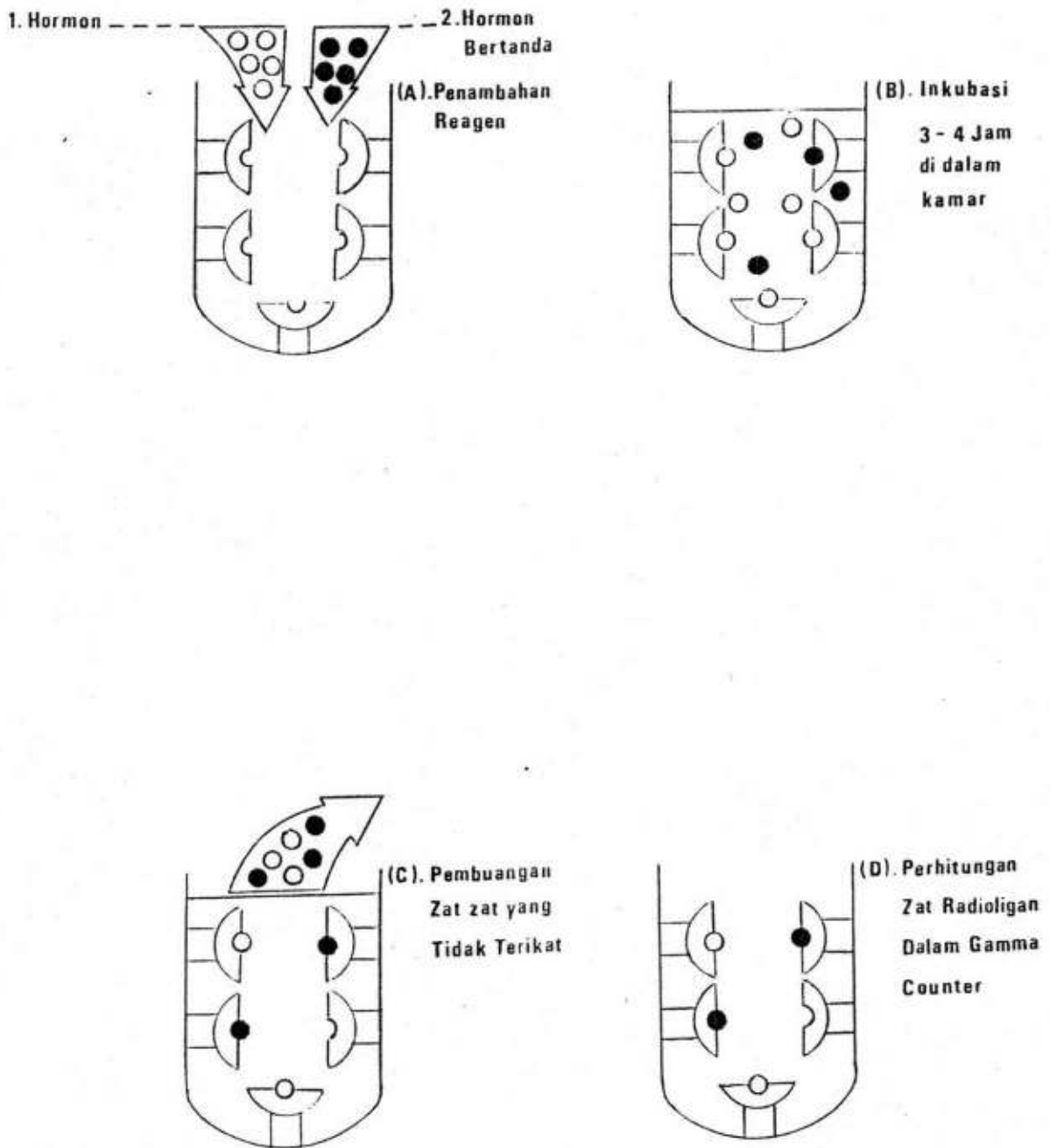
cm dengan perantaran jarum 15G yang segera dicabut setelah kanula masuk. Ujung luar kanula tadi dihubungkan dengan klep yang bisa dibuka dan tutup untuk memudahkan dalam pengambilan darah. Darah mulai diambil setiap 20 menit dimulai 60 menit sebelum hingga 180 menit setelah penyuntikan 200 ug GnRH. Pada setiap pengambilan darah pertama, kedua dan seterusnya 0.5 ml 2% heparin dimasukkan didalam kanula agar tidak terjadi pembekuan darah didalam kanula tersebut selama fase 20 menit. Darah dibawa ke Leboratorium Ilmu Kebidanan Veteriner, dibiarkan pada suhu kamar selama 3 jam dengan kemiringan 45^o dan tusukan pada permukaan darah tersebut. Serum yang timbul lalu diisap dengan pipet isap untuk disimpan dalam tabung gelas 2 ml pada suhu - 18^o C (freezer, sharp) hingga assay hormon dilakukan.

5. Analisa hormon progesteron

Penentuan kuantitatif kadar hormon ini dilakukan dengan menerapkan teknik radioimmunoassay fase padat, dimana 125 I-P4 sebagai labelnya (DPC, USA). Tabung prophylyene berukuran 70 x 12 mm yang sudah dilapisi antibodi progesteron didalamnya dipakai dalam assay menurut protokol yang dibuat. binding (NSB) masing masing tanpa anti bodi, maximum binding atau binding (MB/Bo), standard atau calibrator 0 - 20 ng Quality control pada kadar tinggi (Qc-h), Quality control kadar rendah (Qc-1), sampel yang akan diukur dan kembali diisi dengan tabung Qc-h, Qc-1 dan MB. Semua tabung assay

dibuat dengan duplikat. Kedalam tabung yang sudah dilabel sesuai dengan protokol diberikan standard, sampel air susu dan quality control masing masing sebanyak 100 ul dengan pipet bersekala 10-100 ul (Eppendorf Varipette 4710).

Selanjutnya 1000 ul larutan tracer ¹²⁵I-P4 dimasukkan ke dalam semua tabung assay dengan memakai pipet yang bersekala 10-1000 ul (Eppendorf Repeater 4780). Setelah dilakukan pengocokkan selama 5-10 detik diatas pengocok listrik (Ika-Werk, VF2), kemudian semua assay dibiarkan pada suhu kamar minimum 3 jam. Setelah waktu ini terlewatkan semua cairan didalam tabung assay dibuang dengan cara membalikkan permukaan tabung ke dalam penampungan sampah radioaktif . Selanjutnya tabung tabung assay itu dibiarkan terbalik diatas kertas isap selama 5 menit untuk memberikan kesempatan tracer bebas keluar dari tabung assay. Peneraan kadar hormon dilakukan dengan memasukkan masing masing tabung assay selama 1 menit ke dalam Gamma-counter (Mini-assay type 6-20, Mini-Instruments).



Gambar 8 . Prinsip Dasar Teknik RIA Fase padat Untuk Progesteron Air Susu

6. Analisis Kadar LH

Untuk deteksi kadar LH ini juga dipakai radioimmunoassay fase padat. Teknik ini telah diterapkan oleh Snook dkk (1971). Tetapi penerapannya disini dengan sedikit modifikasi dan dilakukan pelapisan antibodi LH (coating) sendiri di Laboratorium. Demikian pula LH (Bovine) dilabel sendiri dengan ¹²⁵I-Na (Amersham, Uppsala) sehingga pemusatan pikiran lebih banyak diperlukan untuk melabel hormon ini daripada analisis hormonnya sendiri.

6.1. Cara melapisi tabung assay dengan antibodi LH(coating)

Tabung prophylyene berukuran 12 x 75 mm yang sudah diatur menurut protokol diisi 800 ul buffer karbonat PH 9,2 (Merck) dan 100 ul antibodi LH (NIH-LH) 1:4000, kecuali tabung non specific binding (NSB). Kemudian dikocok diatas pengocok listrik selama 1 menit . Setelah dibiarkan berinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar , cairannya diambil kembali dengan pompa isap lalu dicuci dengan 1000 ul aquabidest .

6.2. Cara melabel LH

Teknik pemberian tanda (labelling) Luteinizing hormon (LH) dengan ¹²⁵I-Na memakai oxydant Chloramine-T (Merck) . 5 ug LH sapi dicampur dengan 50 ul 0,5M buffer fosfat (PBS, Merck) yang berada dalam vial gelas bervolume 2 ml ditambahkan 10 ul radioaktif yang mengandung 1 millicuri

125
 (mCi) I-Na (Amersham, Uppsala) lalu ditutup dan diketok dengan hati-hati dinding vial bagian luarnya selama 60 detik. Selanjutnya 30 ug chloramine-T dalam 15 ul 0,05M buffer fosfat (PBS, Merck) ditambahkan melalui tutup vial tadi memakai jarum dan ditumpahkan tepat di atas campuran tadi. Setelah jarum dicabut dinding vial diketok lagi dengan hati-hati selama 2 menit. Kemudian campuran ini segera ditambahkan larutan metabisulfit (60 ug dalam 30 ul 0,05M PBS dengan jarum di atas permukaan campuran tersebut. Setelah jarum dicabut kembali, dinding vial diketok-ketok lagi perlahan selama 30 detik dan juga melalui perantaraan jarum, 100 ul 16% larutan sukrosa (transfer solution) dimasukkan lalu semua campuran ini disedot ke dalam spuit untuk dimasukkan ke atas sephadex column G-25. Sisa campuran yang masih berada di dinding bagian dalam lalu diberikan 100 ul larutan 8% sukrosa (rinse solution) lalu disedot kembali dan dimasukkan lagi di atas sephadex column.

6.3. Pembuatan campuran sephadex column G-25

Sehari sebelum pemakaian sephadex column, maka ditimbang 12,5 mg sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala) lalu ditambahkan 100 ul 0,01M buffer fosfat 0,1% gelatin (PBSG, Merck) PH 7,0 dan kemudian disimpan dalam suhu 2-5 °C. Tiga jam sebelum dipakai campuran sephadex dibiarkan pada suhu kamar, kemudian dimasukkan secara bertahap ke dalam

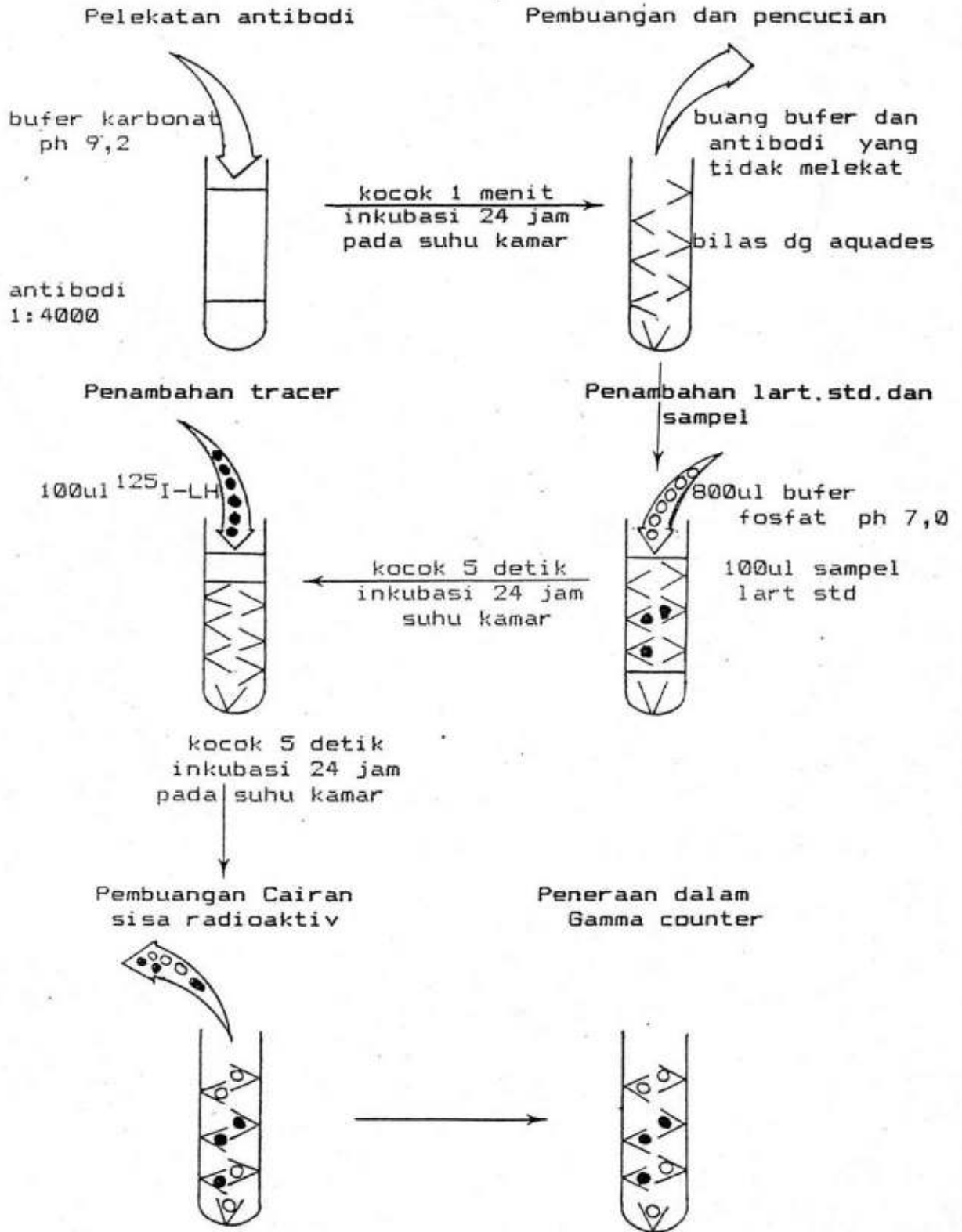
pipet 10 ml yang sudah diubah bentuk dengan penambahan selang karet, klem dan gelas wool hingga ketinggian sephadex column 17 cm.

6.4. Cara pemisahan LH berlabel

Sebelum penetesan campuran LH dengan ¹²⁵I-Na dimulai, permukaan cairan yang berada di atas permukaan sephadex diturunkan hingga rata dengan permukaannya. Penetesan campuran hormon dengan radioaktif dilakukan tepat di atas permukaan sephadex lalu klem dibuka dan ditampung setiap tabung assay 20 tetes hingga tabung ke 30 (tetes ke 600). Karena volume campuran radioaktif tadi kecil, maka waktu penetesan pada tabung penampungan pertama sudah diikuti dengan penambahan larutan 8% sukrosa (rinse solution). Selanjutnya setiap tabung ditera di dalam Gamma-counter

selama 1 menit. Puncak ikatan ¹²⁵I-LH terjadi pada tabung No. 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 (gambar 33). Selanjutnya campuran LH berlabel ini dicampur jadi satu, kemudian ditambah dengan 7 ml 0,05M PBS 0,1% gellatin PH 7,5 sehingga setiap 100 ul ¹²⁵

I-LH ini mempunyai aktifitas antara 22.000 - 23.000 count per minute (cpm), dimana siap untuk dipakai sebagai label assay LH selanjutnya.



Gambar 9 . Prinsip Dasar Assay LH dengan RIA Fase Padat

6.5. Cara melakukan assay LH

Analisa LH ini dimulai dengan penambahan 800 ul 0,01M PBS 0,1% gelatin PH 7,0 ke dalam tiap tiap tabung assay . Kemudian diikuti dengan penambahan 100 ul standar LH (Kalibrator dengan pengenceran berseri , 40 ng/ml - 0,64 ng/ml) dengan selanjutnya dilakukan penambahan 100ul serum yang akan diperiksa ke dalam tabung assay menurut protokol (Tc, NSB, BM/Bo, Standard, Qc-1, Qc-h, sampel yang diukur, Bo, dan lagi Qc-1 serta Qc-h). Setelah dilakukan pengocokan di atas pengocok listrik selama 5 detik lalu dibiarkan dalam suhu kamar selama 24 jam. ¹²⁵I-LH (tracer atau radioligand) sebanyak 100 ul dimasukkan ke dalam setiap tabung setelah waktu inkubasi dalam suhu kamar terlewatkan. Selanjutnya lagi diinkubasikan dalam suhu kamar selama 24 jam. pada hari terakhir yaitu hari ke 4 dari sejak coating, semua isi cairan kecuali tabung Tc , dibuang dengan cara mengisap dengan pompa isap . Setelah 15 menit semua tabung assay ditera 1 menit di dalam Gamma counter.

7. Perhitungan kadar hormon progesteron dan LH

$$\% \text{ Binding} = \frac{\text{Mean cpm sampel} - \text{mean cpm NSB}}{\text{Mean cpm MB} - \text{mean cpm NSB}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ MB/Bo} = \frac{\text{Mean cpm MB} - \text{mean cpm NSB}}{\text{Mean cpm Tc} - \text{mean cpm NSB}} \times 100\%$$

$$\% \text{ NSB} = \frac{\text{Mean cpm NSB}}{\text{Mean cpm Tc}} \times 100\%$$

Data kadar progesteron dan LH yang didapat dalam satuan cpm (pembacaan dalam layar Gamma-counter) dirubah menjadi ikatan dalam persen (% binding) lalu di-interpolasikan di atas kertas grafik logit-log. Sehingga data % binding standar didapat dalam bentuk persamaan garis lurus (Chard, 1982., Anonimus. 1984a). Dengan memasukkan nilai % binding pada standar (sumbu Y) dan memotong persamaan garis lurus di atas, maka setelah diproyeksikan ke sumbu X akan didapat kadar dalam satuan ng/ml (Abraham, dkk. 1977., Castellonos dan Edqvist. 1978., Chard. 1982., Mahaputra. 1983., Anonimus. 1984).

8. Keabsahan teknik RIA (Validity)

Untuk mendapatkan kesamaan pandangan pada penggunaan teknik RIA ini perlu diadakan uji keabsahan untuk menguji bahan (anti bodi, tracer dan sampel) serta alat alat(pipet, tabung assay dan Gamma counter) yang dipakai sehingga suatu assay dapat dipercaya. Uji ini meliputi:

8.1. Kekhasan (Specificity)

Uji ini dimaksudkan untuk mengetahui seberapa jauh adanya hubungan komposisi suatu hormon yang dapat berikatan dengan anti hormon progesteron yang sedang di assay. Di dalam satu assay (batch) progesteron, di dalamnya juga diselipkan 5 macam hormon steroid seperti : 100 ng/100ul progesteron, 100 ng/100ul cortison, 100 ng/100 ul MPA, 100 ng/100 ul pregnenolone dan 100 ng/100

ul testosteron. Hasil reaksi silang antara anti bodi progesteron didapat masing masing: 98,5 %, 0,2%, 0,5% , 0,2 %, dan 0,1% untuk progesteron, cortison, medroxyprogesteron acetat, pregnenolone dan testosteron.

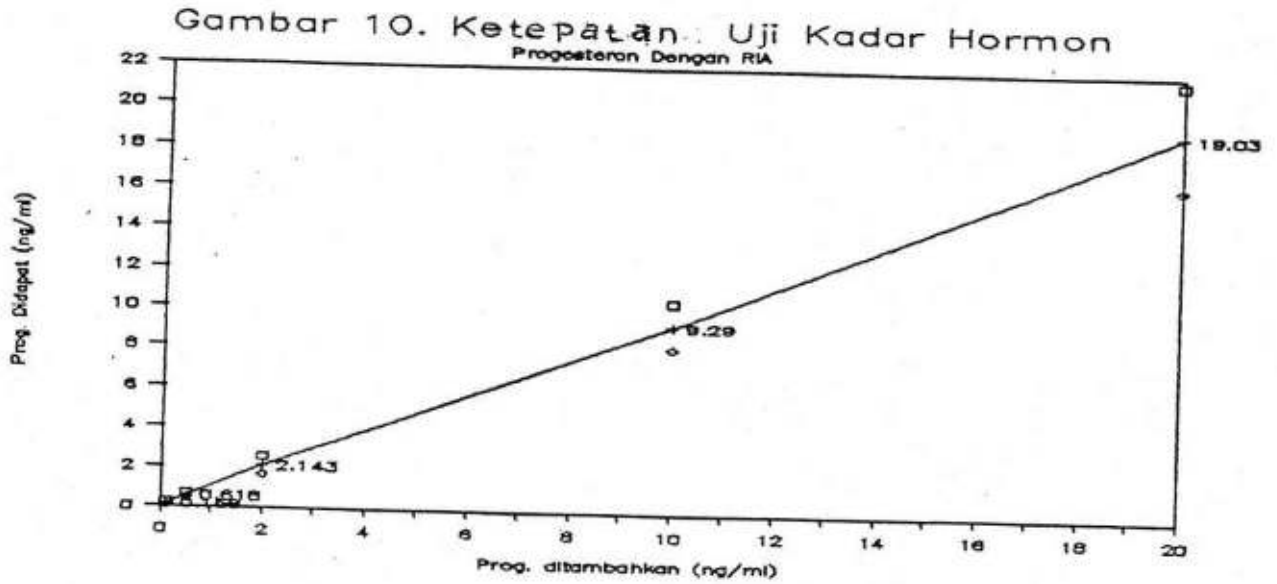
8.2. Kepekaan (Sensitivity)

Adalah jumlah terkecil dari hormon yang masih dapat terdeteksi oleh teknik penerapan RIA ini. Pada assay ini memakai rumus : $Bo + 2 Sd$.

Macam	n	Rata rata cpm	Bo	2Sd	% binding	Kepekaan
Prog	10	6472,1		286,5	95,6	0,8nmol/l 0,25ng/ml
LH	10	7423,6		283,3	95,5	0,50ng/ml

8.3. Ketepatan (Accuracy)

Ketepatan untuk menera kadar hormon dalam sampel, perlu untuk diadakan uji ketepatannya dengan salah satu cara yaitu dengan menghitung Qualitative recovery. Teknik yang dipakai adalah dengan penambahan jumlah tertentu dari beberapa standar lalu diuji besarnya kadar yang didapat kembali. Lima tingkat kadar progesteron yang berbeda : 0 ; 0,5; 2,0; 10,0; dan 20,0 ng/ml ditambahkan dalam satu assay . Hasil yang didapat masing masing sebesar 0; 0,618; 2,143; 9,29 dan 19,03 ng/ml. Ketepatannya assay masing masing mendekati 96 % dengan membentuk persamaan garis lurus (gambar 10).

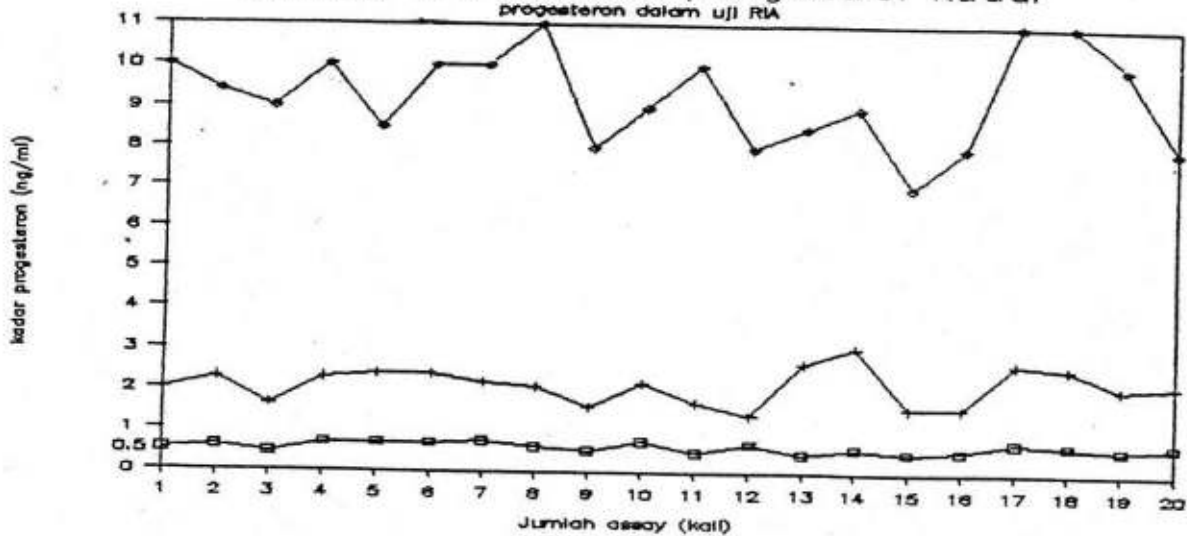


8.4. Kecermatan (Precision)

Uji ini dimulai dengan menghitung besarnya variasi Koefisien dari intra-assay dan inter-assay kualitas pengontrol (Qc-H) dan peneraan kembali kadar progesteron yang ditambahkan, atau disebut quantitative recovery (gambar 11).

Parameter	n	Rata-rata Qc-h (ng/ml)	Sd	Cv(%)
Inter-assay progesteron	19	3,53	0,37	10,48
Intra-assay progesteron	8	4,04	0,24	5,9
Inter-assay untuk LH	6	3,93	0,38	9,6

Gambar 11. Kualitas pengontrol kadar progesteron dalam uji RIA



9. Observasi birahi

Pemantauan birahi dilakukan oleh pemerah dan peternak 3 kali sehari, yaitu 2 kali waktu pemerahan (03,00 - 11,00) dan sore hari jam 17,00. Indikasi birahi ditandai dengan adanya kegelisahan, menguak berkali kali, vulva membengkak dan kemerahan, produksi susu menurun keluar cairan atau lendir jernih tembus cahaya dari vulva.

10. Pemeriksaan struktur ovarium dan kebuntingan per rektal

Pemeriksaan ini dilakukan untuk menentukan sapi yang menderita struktur patologis ataupun karena tidak adanya struktur di dalam ovariumnya (hypofungsi). Hal ini dilakukan atas keluhan dari peternak bahwa sapinya setelah melahirkan, lama tidak timbul kembali birahi atau pernah kawin tetapi

tidak ada tanda tanda terjadinya kebuntingan. Pemeriksaan ini terutama dilakukan pada sapi sapi percobaan IV. Pada sapi sapi yang sudah dikawinkan maka 60 hari berikutnya dilakukan pemeriksaan kebuntingan per rektal dengan mencari indikasi kebuntingan berupa : uterus asimetris, adanya korpus luteum aktif, membran selaput foetus, posisi servix uteri, dan fluktuasi dinding uterus.

11. Evaluasi kadar progesteron untuk klasifikasi status reproduksi.

Seekor sapi dapat dinyatakan anoestrus bila minimal 3 sampel yang diambil selang 2 kali seminggu, kadar progesteronnya tetap rendah pada kadar basal. Birahi tenang (silent heat) terjadi bila ditemukan adanya fluktuasi kadar progesteron tetapi sebelumnya tidak didahului dengan tanda tanda birahi. Sapi yang sedang mengalami birahi kadar progesteronnya selalu mendekati kadar basal (0 ng/ml). Pada fase luteal kadar progesteronnya $>0,75$ ng/ml dan $<0,75$ ng/ml adalah fase folikuler. Sapi yang mengalami kematian embrio dini (<30 hari) bila kadar progesteron pada 22 hari setelah IB tinggi ($>0,75$ ng/ml) tetapi pada 29 hari progesteronnya kembali ke kadar basal. Sedangkan sapi yang mengalami kematian embrio dini (<60 hari) bila kadar progesteron pada 22 dan 29 hari tinggi ($>0,75$ ng/ml) tetapi setelah palpasi rektal tidak ditemukan adanya kebuntingan atau birahinya timbul kembali.

12. Analisis statistik (Steel dan Tory, 1980; Microstat copy right, 1986)

1. Data deskriptiv berupa persentase, harga rata rata dan grafik baik poligonal atau histogram dipakai untuk menyajikan data untuk kelompok percobaan I, Kelompok percobaan II, dan beberapa dari percobaan III, IV, V, dan percobaan VI.
2. Uji Anava satu arah dipakai dalam menguji adanya perbedaan rata rata kadar progesteron waktu dilakukan IB dengan terjadinya kebuntingan, tidak bunting dan kematian embrio dini. Demikian pula uji ini dipakai untuk membedakan kadar progesteron pada air susu penuh, air susu skim, plasma dan serum darah, serta untuk membedakan kadar progesteron sapi yang menderita kista ovarium serta kecepatan timbulnya birahi. Demikian pula untuk menguji skor status reproduksi antara ke tiga daerah peternakan Surabaya, Grati dan Puspo dipakai uji Anava satu arah ini.
3. Anava dua arah dipakai untuk membedakan kadar hormon progesteron sesaat pengobatan dengan puncak yang dicapai waktu sedang pengobatan dengan spon, MPA, PRID dan PRID+LH. Demikian pula uji ini dipakai untuk membedakan kadar progesteron dan LH pada 5, 10, 21, dan 42 hari pasca-lahir.
4. Uji-t dipakai untuk membedakan masing masing kelompok yang menunjukkan tingkat beda bermakna pada uji Anava. Untuk

membedakan panjang daur birahi pertama dengan kedua dan kadar progesteron pada daur birahi pertama dengan kedua juga dipakai uji-t setelah dilakukan uji normalitas terlebih dahulu.

5. Uji Chi-Kuadrat dipakai untuk mengetahui beda jumlah sapi yang birahidan ovulasi setelah pengobatan PGF2 alfa, HCG ataupun MPA-spon, PRID, PRID+LH dan GnRH, setelah data dalam bentuk persen sebelumnya dirubah dengan transformasi Arcsin.

6. Uji korelasi dipakai untuk mengetahui hubungan antara kadar progesteron dan LH pada 5,10,21 dan 42 hari pasca-lahir, serta hubungan kadar progesteron pada air susu penuh, susu skim, plasma dan serum darah.

Semua aturan keputusan untuk menerima hypotesis alternatif dilakukan atas dasar besarnya nilai probabilitas $P < 0,05$. Penolakan hypotesis alternatif dilakukan bila besarnya nilai probabilitas $P > 0,05$.

12. Tempat penelitian

Penelitian dengan kegiatan laboratorium sebagian besar dilakukan di Laboratorium Ilmu Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga ditambah beberapa konfirmasi standar hormon di Laboratorium Teknik aplikasi isotop IAEA/ FAO Vienna Austria. Sampel diambil dari daerah peternakan sapi perah Surabaya, Grati dan Puspo.

13. Waktu penelitian

Penelitian ini dimulai dengan pengumpulan sampel air susu sejak bulan Maret 1984 dan pengumpulan darah dimulai bulan Mei 1985 yang disusul dengan assay kadar progesteron dan LH menurut keperluan. Keseluruhan penelitian ini selesai pada bulan Oktober 1988.

JADWAL KERJA PENELITIAN

Th /	/Bl	Aktifitas											
		Studi l pus- l taka	Meran- l cang l projek	Per- l coba l l baan	Per- l coba l l baan	Pelak- l sanaan l l riset	Kolek- l si l l data	Anali- l sis l stat	Uji l Hypo- l l tesis	Penu- l lisan l l tesis			
1 9 8 4	3	1	x	1	x	1	1	x	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	x	1	x	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	1	x	1	x	1	x	1	x	1	x	1	1
1 9 8 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 9 8 6	6	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
1 9 8 7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	6	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 9 8 8	9	1	x	1	1	1	x	1	x	1	x	1	x
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	12	1	x	1	1	1	1	1	1	x	1	x	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	x	1	1	1	x	1	x	1	1	1	1
1 9 8 9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	x
	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1