

**Penentuan Kadar Progesteron dalam Serum Darah Sapi dengan Metoda RIA( *Radio Immuno Assay* ) setelah Pemberian Berbagai Dosis Progesteron MPA ( *Medroxy Progesteron Acetate* ) Transvaginal**

**The Level of Progesteron in Blood Sera Cows Using RIA( *Radio Immuno Assay* ) after Progesteron Transvaginal MPA ( *Medroxy Progesteron Acetate* )**

✓ Sunaryo Hadi Warsito, Herry Agoes Hermadi

Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785. Fax. 031-5993015

Email : eshawe\_drh@yahoo.com

**Abstract**

The Methods of investigation are carried out on experimental as much as 20 cows in "Agro Fauna Kertosari" in Mojosari-Mojokerto. Experimental design used was completely randomized design which is divided into four treatment groups, each group consisted of 5 cows. the data analyzed by Analysis of Variance and be continuous with the Least Significant Difference Test. The group consists of : Po as a control group given injections PGF<sub>2</sub> $\alpha$  20 mg twice 11days interval. P1 group given 1.5 g of progesterone + 10 mg estradiol benzoas, P2 given 1 g of progesterone + 10 mg estradiol benzoas, P3 given 900 mg progesterone + 10 mg estradiol benzoas, subsequent diagnosis of pregnancy was performed on day 28 after artificial insemination with progesterone level examination conducted by the RIA method, by taking 5 cc of blood from the jugular vein before treatment and after removal of transvaginal MPA and 28 days after artificial insemination. The results showed that injected of PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and transvaginal MPA give effect to the increased levels progesterone in cow's blood:

**Keywords :** Transvaginal MPA, RIA

**Pendahuluan**

Teknik penentuan kadar hormon progesteron secara kuantitatif dapat dilakukan dengan teknik *Radio Immuno Assay* (RIA) maupun dengan teknik *Elissa*. Kadar progesteron serum darah dalam kondisi fase folikuler dan birahi mendekati 0 ng/ml. Sedangkan pada progesteron serum darah pada fase luteal antara 1-2 ng/ml. Sedangkan kondisi kebuntingan menunjukkan kadar lebih besar 2 ng/ml. (Mahaputra, 1991).

Jenis pemacu birahi dari bahan dasar CIDR adalah jenis obat yang sama dengan PRID yang mengandung 1.9 gr progesteron yang terdapat pada permukaan silicon dan dikemas dalam gelatin yang mengandung 10 mg estradiol benzoas. Kadar progesteron dalam darah akan meningkat sejalan dengan fase luteal normal selama 3 - 4 hari setelah dimasukkan ke dalam vagina. Waktu penggunaan CIDR bisa dipersingkat sampai minimal 7 hari dengan pemakaian PGF<sub>2</sub> $\alpha$  secara simultan (Storhben, 2011; Fricke, 2011).

Jenis lain yakni *Synchromate B* dari Amerika Serikat, obat ini merupakan *implant* dari *norgestomet* yaitu suatu jenis gestagen yang mempengaruhi kebuntingan yang ditransfer dari lapisan hypoderm

tanaman. Penambahan 5 mg estradiol disuntikkan *intra muscular* secara simultan dengan *synchromate B* hasilnya bisa dilihat setelah birahi.

Tanaka dkk (2001) menyatakan bahwa batasan sinkronisasi birahi dengan menggunakan obat-obatan atau terapi hormon luteal dengan pengaruh rendah perlu dikombinasikan dengan penggunaan estradiol dan PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Kebuntingan yang rendah biasanya karena waktu IB yang kurang tepat, untuk itu IB dilakukan setelah pemeriksaan birahi.

Preparat progesteron sponge intravaginal pertama kali digunakan pada tahun 1965, Shelton melaporkan perkembangan metode penyerentakan birahi dengan menggunakan senyawa hormon progesteron dengan merek SC-9880 yang ditempatkan dalam vagina domba. Penggunaan tipe ini progesteron dapat diserap melalui mukosa vagina secara perlahan-lahan dalam waktu  $\pm$  14 - 16 hari, setelah waktu tersebut dilakukan pencabutan sponge dan selanjutnya akan terjadi birahi serta ovulasi (Hullet dan Shelthom, 1980). Keberhasilan lain menyebutkan bahwa penggunaan *Cronolone* dengan dosis 30 - 40 mg secara intravagina selama 14 - 16 hari dan birahi akan timbul setelah 24 - 72 jam dari pencabutan. Sedangkan penyerentakan birahi pada

domba dengan menggunakan *Medroxy Progesterone Acetate* (MPA) telah dilaporkan keberhasilan oleh Gordon (1977); Evans dan Maxwell (1987) menyatakan bahwa penggunaan sponge intravaginal yang mengandung 60 mg MPA sangat efektif untuk penyerentakan birahi pada domba dan kambing.

Induksi birahi pada sapi perah donor yang akan dilakukan transfer embrio dengan menggunakan *Progesterone Release Intravaginal Device* (PRID) dicabut pada hari ke 14 dan *Human Chorionic Gonadotropine* (HCG) diberikan pada hari ke 15, sedangkan transfer embrio dilakukan pada hari ke 23 (Mahaputra, 1991).

### Materi dan Metoda Penelitian

Pemeriksaan Kadar Progesteron Serum Dara Sapi Sebelum perlakuan, Setelah Pencabutan Transvaginal MPA dan saat Kebuntingan (28 setelah IB). Dibutuhkan sebanyak 20 ekor sapi betina yang telah dipastikan pernah beranak dan berumur 2-3 tahun, yang dikelompokkan secara acak menjadi 4 kelompok dengan masing-masing perlakuan mendapatkan 5 ulangan dan setelah terjadi birahi dilakukan inseminasi buatan. Sebelum pemberian MPA intravaginal dan sesudah pencabutan hari ke 7 dilakukan pengambilan darah melalui vena jugularis sebanyak 5 cc untuk pemeriksaan kadar progesteron dengan metode RIA. Selanjutnya pemeriksaan kebuntingan dilakukan pada hari ke 28 pasca inseminasi buatan dengan metode RIA.

- P0 (Kontrol) : Sapi diberikan injeksi PGF2a *intra uterin* 2X interval 11 hr
- P1 : Sapi Transvaginal 1.5 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas
- P2 : Sapi 1 Transvaginal gram MPA + 10 mg estradiol benzoas
- P3 : Sapi Transvaginal 900 mg MPA + 10 mg estradiol benzoas

Pengamatan timbulnya birahi setelah pencabutan transvaginal MPA dicatat dengan membedakan antara kelompok kontrol (P0) dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3) pada sapi mengacu pada hewan coba di atas.

### Teknik Assay Kadar Hormon Progesteron

Kadar progesteron serum darah dianalisis dengan *Radio Immuno Assay* (RIA) fase padat yang menggunakan radioaktif <sup>125</sup>I sebagai atom bertanda. Tabung *prophylene* berukuran 70 x 12 mm yang sudah dilapisi antibodi progesteron di dalamnya dipakai dalam pemeriksaan menurut protokol yang dibuat. Binding (NBS) masing-masing tanpa antibodi, maksimum binding atau binding (MB/Bo), standart atau calibrator 0-20 mg *Quality control* pada

kadar tinggi (Qc-h). *Quality control* kadar rendah (Qc-l), sampel yang akan diukur dan kembali di isi dengan tabung Qc-h, Qc-l dan MB.

Semua tabung pemeriksaan dibuat dengan duplikat kedalam tabung yang sudah dilabel sesuai dengan *protocol* diberikan semua tabung pemeriksaan dibuat dengan duplikat kedalam tabung yang sudah dilabel sesuai *protocol* diberikan standart. Sampel serum darah dan *quality control* masing-masing sebanyak 100 ml dengan pipet berskala 10-100 µl (*Eppendorf Varipette 4710*).

Selanjutnya 1000 µl larutan *tracer* <sup>125</sup>I-P-4 dimasukkan kedalam tabung pemeriksaan dengan memakai pipet yang berskala 100-1000 µl (*Eppendorf Repeater 4780*). Setelah dilakukan pengocokan selama 5 sampai 10 detik diatas pengocok listrik (*Ika-Werk, VF<sub>2</sub>*) kemudian semua pemeriksaan dibiarkan pada suhu kamar minimum tiga jam. Setelah waktu ini terlewatkan semua cairan didalam tabung pemeriksaan dibuang dengan cara membalikkan permukaan tabung ke dalam penampungan sampah radioaktif. Selanjutnya tabung-tabung pemeriksaan itu dibiarkan terbalik diatas kertas hisap selama 5 menit untuk memberikan kesempatan *tracer* bebas keluar dari tabung pemeriksaan. Peneraan kadar hormon dilakukan dengan memasukkkan masing-masing tabung selama satu menit ke dalam *Gamma-counter* (*Minissay type 6-20, Mini-Instrument*).

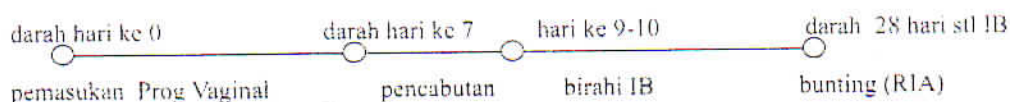
Pada prinsip reaksinya terjadi suatu persaingan antara hormon progesteron yang ditera (sampel) dengan progesteron yang bertanda (*tracer*) sehingga makin tinggi kadar progesteron dalam serum dalam sampel makin sedikit progesteron bertanda (IAEA, 1984; Mahaputra, 1986). Sehingga selanjutnya kadar hormon tersebut dapat dihitung dengan menentukan prosentase ikatannya (% binding).

$$\text{NSB} : \frac{\text{cpm 1} + \text{cpm 2}}{2} = \text{cpm NSB}$$

$$\text{Bo} : \frac{\text{cpm Bo} - \text{x NSB}}{\text{x TC} - \text{x NSB}} = 100 \%$$

$$\text{Binding} : \frac{\text{x cpm sampel} - \text{cpm NSB}}{\text{x cpm Bo} - \text{x cpm NSB}} = 100 \%$$

cpm = *counter per minute*  
 Bo = ikatan yang dianggap 100 %  
 NSB = *Non Specific Binding*  
 (IAEA, 1984)



### 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 akan digunakan adalah : analisis sidik ragam (Anova) dan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (Steel and Torrie, 1995).

### Hasil dan Pembahasan

Pengisian hormon progesteron pure buatan Up John Company Pulvers penyediaan di timbang sesuai dengan kebutuhan (dosis) yang dibutuhkan dengan timbangan analitik, selanjutnya ditambahkan gelatin eroda (GC) 10 gr. Untuk membuat suatu adonan antara GC dengan menambahkan 5 cc aquabides steril diaduk secara merata dan diletakkan dalam plate, selanjutnya Sponge transvaginal diolesi adonan tersebut dan dikeringkan dalam temperatur 45-50 °C dalam oven. Akhirnya akan terbentuk progesteron (MPA) transvaginal yang siap untuk digunakan.

Bentukan transvaginal MPA yang sudah diberi gelatin eroda dimasukkan ke dalam vagina sapi selama 7 hari, sehingga diharapkan terjadi *soft release* dari progesteron yang diserap oleh mukosa vagina sapi yang mengalami perlakuan. Sedangkan pada kontrol diberikan suntikan PGF2a secara *intra uterin* dan diulang 11 hari berikutnya. Selanjutnya sapi akan menunjukkan gejala birahi dan berikutnya dapat dilakukan inseminasi buatan.

### Pengambilan Darah untuk Memeriksa Kadar Progesteron

Pengambilan darah yang pertama dilakukan saat sebelum perlakuan memasukkan bentukan transvaginal MPA ke dalam vagina sapi dan yang kedua dilakukan sesaat sesudah pencabutan. Selanjutnya dilakukan pemisahan bagian darah tersebut untuk diambil serumnya dan kemudian disimpan di dalam freezer sambil menunggu pengambilan darah yang terakhir pada 28 hari sesudah inseminasi buatan atau kawin suntik. Sehingga pemeriksaan kadar progesteron dalam darah sapi dengan metode RIA dilakukan sesudah semua koleksi darah selesai.



Gambar 1. Proses pengambilan darah dari vena jugularis

Analisis uji statistik hasil - hasil penelitian kadar progesteron serum darah sapi sebelum perlakuan, sesudah pencabutan transvaginal MPA dan saat kebuntingan dapat dilihat pada tabel - tabel berikut di bawah ini.

Tabel 1. Kadar progesteron darah sapi sebelum perlakuan

Kelompok Perlakuan	Kadar Progesteron (ng/ml)
P0 (PGF2a <i>intra uterin</i> )	0,41 ± 0,10
P1 (1,5 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	0,38 ± 0,13
P2 (1 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	0,40 ± 0,14
P3 (0,9 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	0,40 ± 0,14

Keterangan : Pada data di atas tidak ada perbedaan yang nyata ( $p \geq 0,05$ )

Tabel 2. Kadar progesteron darah sapi sesudah pencabutan transvaginal MPA

Kelompok Perlakuan	Kadar Progesteron (ng/ml)
P0 (PGF2a <i>intra uterin</i> )	1,68 ± 0,64
P1 (1,5 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	1,72 ± 0,64
P2 (1 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	1,72 ± 0,42
P3 (0,9 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	1,58 ± 0,43

Keterangan : Pada data di atas tidak ada perbedaan yang nyata ( $p \geq 0,05$ )

Tabel 3. Kadar progesteron darah sapi saat kebuntingan

Kelompok Perlakuan	Kadar Progesteron (ng/ml)
P0 (PGF2a <i>intra uterin</i> )	5,48 ± 3,03
P1 (1,5 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	7,80 ± 3,19
P2 (1 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	10,28 ± 7,66
P3 (0,9 gram MPA + 10 mg estradiol benzoas)	5,60 ± 2,88

Keterangan : Pada data di atas tidak ada perbedaan yang nyata ( $p \geq 0,05$ )

Berdasarkan hasil pengujian secara statistik dengan menggunakan *Analysis of Varians*, pada penelitian ini menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata dari hasil pemeriksaan kadar progesteron. Hal ini berarti bahwa dengan dosis yang paling kecilpun (0,9 gram MPA) masih dapat memberikan hasil yang sama dengan kontrol (PGF2a) ataupun dengan dosis yang paling besar (1,5 gram MPA).

Berdasarkan hasil pada tabel 1, menunjukkan bahwa kadar progesteron dalam serum darah hampir

mendekati 0 ng/ml. Hal ini kemungkinan kelompok sapi tersebut dalam kondisi fase folikuler. Sedangkan pada tabel 2 menunjukkan kadar progesteron yang masih tinggi. Hal ini memang logis karena terjadi penyerapan progesteron melalui mukosa vagina pada perlakuan P1, P2 dan P3 ataupun P0 akibat pengaruh PGF2 $\alpha$ . Namun beberapa saat kemudian (jam) kadar progesteron tersebut akan mengalami penurunan seiring dicabutnya Transvaginal MPA ataupun akibat penyuntikan kembali PGF2 $\alpha$  pada kontrol dan selanjutnya terjadi proses birahi. Sementara itu pada tabel 3 menunjukkan hasil kadar progesteron yang sangat tinggi. Hal tersebut menandakan kemungkinan besar kelompok sapi tersebut dalam kondisi sedang bunting. Pada ketiga tabel tersebut sejalan dengan pendapat Mahaputra (1991), yang menyatakan bahwa kadar progesteron serum darah dalam kondisi fase folikuler dan birahi mendekati 0 ng/ml. Sedangkan pada progesteron serum darah pada fase luteal antara 1-2 ng/ml. Sedangkan kondisi kebuntingan menunjukkan kadar lebih besar 2 ng/ml.

Bila kelompok sebelum perlakuan dibandingkan dengan setelah perlakuan (pencabutan transvaginal MPA ataupun penyuntikan PGF2 $\alpha$ ), maka akan terjadi kenaikan kadar progesteron dalam serum darah pada P0 sebesar 1,27 ng/ml, P1 sebesar 1,34 ng/ml, P2 sebesar 1,32 ng/ml dan P3 sebesar 1,18 ng/ml. Hal ini menandakan bahwa pemberian PGF2 $\alpha$  atau MPA transvaginal direspon oleh hewan coba.

#### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Dosis yang paling kecil (0,9 gram MPA transvaginal) masih dapat memberikan hasil kebuntingan pada sapi, sama dengan dosis yang paling besar (1,5 gram MPA transvaginal).
2. Kadar progesteron darah sebelum perlakuan 0,40 ng/ml, sesudah pencabutan 1,67 ng/ml dan saat kebuntingan 28 hari > 5 ng/ml.

#### Daftar Pustaka

- Evans, G. and W.M.C. Maxwell. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goat. Australia.
- Fricke P. 2011. Timing of AI Relative to behavior Estrus and Synchronized ovulations in Lactating Dairy Cows. Departemen of Dairy Sciences Univ. Wisconsin
- Gordon, I. 1977. Application of Synchronisation of Esterus and Ovulation in Sheep. Proc. Symp on The Management of Reproduction in Sheep and Goat.
- Hulet, C.V. and M. Shelton . 1980 . Sheep and Goat in : Reproductions in Farm Animals. Havez 4<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger. Philadelphia.

- IAEA. 1984. Laboratory Training Manual On Radiomunoassay in Animal Reproduction. Report Series. 233. IAEA. Vienna. 85.161.
- Mahaputra, L. 1986. Pengaruh Kadar Progesteron Air Susu dan LH Serum untuk Menentukan Status Reproduksi dan Upaya Penanggulangan Infertilitas pada Sapi Perah Pasca Lahir. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Mahaputra, L., M. Hariadi dan S. Hardjopranjoto. 1990. Studies On Reproductive Efficiency of Cattle. Using Radioimmunoassay Techniques. International Anatomic Energy Agency. Vienna. 115-126.
- Mahaputra, L. 1991. Transfer Embrio. Seminar Pemanfaatan Teknologi Transfer Embrio. Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Mahaputra, L. 1993 . Ilmu Kebidanan Veteriner. Ed. I. Cet. I. Fakultas Kedokteran Hewan Unair. 32 - 35.
- Storhben D. 2011. Estrus Synchronization Planning for Success. Iowa Beef Center
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistika. Penerbit PT. Gramedia Pustaka. Jakarta.
- Tanaka H, Herliantien dan Z.J.W.L. Deasy . 2001. Fisiologi dan Gangguan Reproduksi. The After Care Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. JICA Indonesia : P : 27 - 29.