

Ketepatan Produksi Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Kering Beku dari Kuda Lokal untuk Meningkatkan Awal Birahi Sapi Madura

The Accuracy of Production Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Frozen Dry from Local Horse for Increasing The Time Onset of Oestrus in Madura Cattle

¹Herry Agoes Hermadi, ²Arief Budhyantoro, ²Tokok Ardianto

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

²Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115

Tlp. 031-5992785 fax.0315993015

e-mail: vetunair@telkom.net

Abstract

The aim of this study was to produce eCG from the local pregnant mares sera. This study identified eCG by conformation of the glycoprotein characteristic. The pregnant mares sera were collected from 10 horses. The protein filtrated by using sephadex G-100. The result of product *eCG* it can be *frozen dry eCG*. The Continued of this study was to evaluate biopotency of eCG from local Indonesian horse and eCG from paten product (PG 600 Intervet Holland) to onset of estrus time, and pregnancy rate of Madura cattle in Sembilangan Village Bangkalan district East Java. This study used 24 female Madura cattle divided by 4 treatment group. All of the cattles were being synchronized of their estrus cycle. After that control group (K) was injected by 600 IU PG 600 Intervet holland, P1, P2 and P3 were injected by eCG local horse product with dosage 600 IU, 300 IU and 150 IU respectively. After the injection of eCG the onset of estrus time were being evaluate. And than using two dimation USG follicle number were examined. The result of this study showed that there were no significance different of onset estrus time between control, P1, P2 and P3 group.

Keywords : Pregnant mares sera, eCG and *frozen dry eCG*. the time of oestrus

Pendahuluan

Penelitian hewan besar pada sapi Madura telah menjadi mesin utama untuk penemuan ilmu dalam biologi reproduksi. Pada awal penelitian tentang gonadotropin menunjukkan bahwa transplantasi jaringan hipofisis anterior dari spesies domestik ke

hewan laboratorium membangkitkan pubertas. waktunya dan konsekuensi reproduksi lainnya (Lunenfeld, 2004). Pemurnian pertama, pada akhir 1960-an, faktor hipotalamus, *gonadotropin releasing hormone* (GnRH), berasal dari ekstrak hypothalami babi (Schally et al., 1971). Merupakan manifestasi

awal dari tradisi ini penemuan, pada tahun 1930, oleh Cole dan Hart bahwa serum dari kuda bunting disuntikkan ke hewan laboratorium merangsang pertumbuhan ovarium (Cole dan Hart, 1930). Komponen bioaktif serum ini bernama *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) untuk mencerminkan bahwa peredarannya terjadi selama 2 hingga 5 bulan kehamilan. Beberapa waktu kemudian, bagian yang bertanggung jawab untuk hormone penstimulasi ovarium ini terlokalisasi pada rahim kuda, sehingga diketahui bahwa hormone itu muncul karena keberadaan janin (Catchpole dan Lyons, 1934). Studi di tahun 1970 yang menegaskan bahwa sumber hormon adalah sel chorionic janin yang menginvasi epitel rahim untuk membentuk cangkang endometrium (Allen dan Moor, 1972).

Sapi Madura merupakan plasma nuftah Indonesia khususnya Jawa Timur di Pulau Madura yang sampai sekarang eksistensinya tetap dipertahankan. Karakteristik budaya dan keunggulan mutu daging sapi madura tidaklah diragukan, tetapi kita harus waspada bahwa peningkatan kualitas dan kuantitas jumlah sapi potong madura ini merupakan kekayaan alam (Natural resources) asli Indonesia.

Peningkatan mutu ternak merupakan salah satu aspek utama dalam pengembangan peternakan sapi potong 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 potong Madura mempunyai kemampuan adaptasi, produksi daging dan reproduksi yang cukup baik di Indonesia. Produksi daging sapi Madura mencapai 50% keatas lebih tinggi dari produksi karkas sapi

potong lainnya.. Dengan pengelolaan sapi Madura selama 305 hari dan 60 hari masa kering diharapkan akan tercapai jarak beranak (calving interval) 12 bulan sehingga sapi Madura tersebut dapat beranak setahun sekali.

Oleh sebab itu perlu dicarikan alternatif dosis hormon *eCG* (Harjopranyoto, 1995). *eCG* (*equine Chorionic Gonadotropin*) pada hewan domestik yang sampai saat ini masih hangat diperbincangkan adalah *eCG* yang berasal dari kuda yaitu *eCG* atau oleh penemunya Harold Cole diberi nama *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (Stabenfeldt and Davidson, 2002). Sampai saat ini penelitian yang berupaya mengkaji kadar *eCG* didalam serum kuda Indonesia (sandel, *CBG2* dan *CBG4*) jarang dilakukan (Wijaya, 2008).

Indonesia memiliki ras kuda asli yaitu sandel. Disamping itu menurut terminologi PORDASI (Persatuan Olahraga Berkuda Seluruh Indonesia) yang dimaksudkan sebagai kuda Indonesia selain kuda sandel adalah juga kuda *crossbred* (*CB*)*G1* sampai dengan *G4*. Kuda *CBG4* ini merupakan hasil persilangan antara kuda sandel (betina) dengan kuda *thoroughbred* (jantan) sampai menghasilkan generasi ke 4 yang penampilan fisik dan prestasi pacunya sudah mendekati (97%) kuda *thoroughbred*. Oleh karena itu oleh PORDASI kuda *CBG4* ditetapkan sebagai kuda pacu Indonesia terbaik (Anonimus, 2000). Fenomena tersebut menyiratkan adanya kemungkinan bahwa kandungan *eCG* didalam serum kuda Indonesia *CBG4* akan mirip atau menyamai kandungan *eCG* didalam serum kuda *thorouhgbred* (Wijaya, 2008). Hormon Equine Chorionic Gonadotropin (*eCG*) yang didapatkan dari serum kuda bunting merupakan hormon *non pituitary*

gonadotropin yang dapat digunakan sebagai sumber hormon karena *eCG* mempunyai efek biologis seperti FSH dan sedikit LH. Pertimbangan lain karena mudah didapatkan di pasaran dengan harga lebih murah dari pada preparat gonadotropin seperti FSH dan LH (Restiadi, 1999).

Penelitian ini akan melakukan Isolasi protein *eCG* dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dalam ultra sentrifus 4°C dan ditambahkan etanol absolute 1:1 dan dimurnikan dengan teknik columns chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein *eCG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan kemudian dibuat sediaan *Frozen Dry* kering beku.

Materi dan Metode Penelitian

Pada garis besarnya penelitian ini dilakukan secara bertahap yang terdiri atas dua tahap sebagai berikut :

Isolasi protein *eCG* dari serum kuda bunting dilakukan dengan ekstraksi dengan penambahan charcoal dan etanol absolut 1:1 dalam ultra sentrifus 4°C dan dimurnikan dengan teknik columns chromatography CM Sephadex G-100. Identifikasi protein *eCG* menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Deodecyl Sulphate polyacrilamid gel electrophoresis*) dan dibuat bentuk sediaan *Frozen Dry*.

Bahan dan Peralatan

Bahan dan alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah serum darah kuda lokal yang diambil dari vena yugularis sebanyak 10 ml per ekor dengan Venoject 10 ml. sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm. Prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein. Dibutuhkan 200 µl

sampel, PBST–PMSF, mikrotube disonifikasi, vortex, etanol absolut dingin 1:1 diinkubasi dalam refrigator. *buffer tris* Cl 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2005). Identifikasi protein *eCG* hasilnya dengan SDS-PAGE protein bands dan dilanjutkan dengan pemeriksaan immune-reactivity dengan monoclonal antibody dari *eCG*. Pemeriksaan dengan menggunakan indirect elisa konsentrasi *eCG* pada kuda local dibuat bentuk sediaan *Frozen Dry*. Hewan coba sapi Madura betina 24 ekor dengan BSC (Body Score Condition) 2 (dua) untuk diterapi sinkronisasi birahi dengan *eCG frozen dry* hasil penelitian.

Pembuatan *eCG*

Serum darah kuda lokal bunting 3-4 bulan yang diambil dari vena yugularis sebanyak 10 ml per ekor dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C (Rifkind *et al.*, 1967). Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit dan bagian endapan dibuang. dilakukan sentrifugasi 3000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit (Hermadi, 2001). Hasil supernatan disaring hingga jernih dan dimasukkan ke dalam tabung *Erlenmeyer* dengan menggunakan kertas saring. Prosedur di atas dilakukan hingga mendapatkan supernatan sebanyak 50 ml (Hinselwood *et al.*, 1991). Selanjutnya sampel digunakan untuk prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein. Dibutuhkan 200 µl sampel dibuat homogen dengan penambahan PBST–PMSF 5 kali sampel kemudian supernatan dimasukkan kedalam mikrotube disonifikasi selama 10 menit kemudian divortex dan disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit ditambahkan etanol absolut dingin 1:1 diinkubasi dalam refrigator selama 1

jam atau semalam. Kemudian disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit kemudian endapan dikeringanginkan hingga bau etanol hilang dan ditambah *buffer tris* Cl 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2005). Sebelum pemeriksaan SDS-PAGE dilakukan pemurnian dengan tehnik coloums chromatographi G-100.

Uji Potensi Biologis *eCG* terhadap Timbulnya birahi pada Sapi Madura.

Sebanyak 24 ekor sapi Madura betina yang telah dipastikan bersiklus birahi normal. 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 mendapat-kan penyuntikan *eCG* hasil penelitian (kelompok perlakuan)/kelompok control disuntik *eCG* 500 IU IM Gonaser Spain intra muscular. Penyuntikan diberikan selama 1 kali pada hari ke 9 pemberian dengan pola *eCG* setelah penyuntikan PGF 2 alfa pertama dilakukan penyuntikan PGF2 α (lutalyse) 25 mg im. Jika birahi dilakukan pemeriksaan USG.

P₀ (kontrol) 5 ekor sapi : Disuntik PG 600. Intervet Holland 600 IU intra muscular.

P₁ (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 150 iu *eCG* hasil penelitian intra muscular.

P₂ (Perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 300 iu *eCG* hasil penelitian intra muscular.

P₃ (perlakuan) 5 ekor sapi : Disuntik 600 iu *eCG* hasil penelitian.

Jadwal pelaksanaan penyuntikan ;

Hari ke 0 PGF2 alfa I *eCG* hari ke 9 Hari ke 11 PGF2 alfa 2
0=====0=====0=====0
Hr 14 IB Birahi USG

Parameter yang diteliti adalah perkembangan folikel, birahi, ovulasi dan kebuntigan sapi Madura setelah penyuntikan *eCG* hasil penelitian dengan pantauan USG hari ke 30.

Rancangan dan Analisis Statistik

Data hasil ekstraksi, identifikasi, isolasi dan karakterisasi *eCG* diolah secara deskriptif. Data yang diperoleh dari jumlah kebuntigan sapi Madura setelah penyuntikan *eCG*, dianalisa secara sidik ragam (Anova) bila terdapat perbedaan perlakuan dilakukan uji lebih lanjut dengan uji Tukey. Sedangkan data tingkat kematangan sel telur dianalisa

dengan uji Khi-Kuadrat (Steel and Torrie, 1991)

Hasil dan Pembahasan

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui profilprotein yang ada pada serum kuda bunting lokal. Identifikasi protein berdasarkan pita-pita protein yang muncul pada elektroforegram. Penentuan berat molekul protein dilakukan dengan bantuan protein standar (BIO-RAD). Berat molekul isolat protein dari serum kuda bunting ditentukan dengan mengplotkan harga *retardation factor* (RF) yang diperoleh pada persamaan regresi linier

$Y = -18933X + 2.2756$. Kurva hubungan antara RF(X) dengan log BM protein standar (Y) dan hasil perhitungan berat molekul pita protein yang terdapat pada serum kuda bunting dapat dilihat pada gambar 1 Ada 3 pita yang teridentifikasi pada serum kuda bunting lokal yang muncul pada pemeriksaan dengan SDS-PAGE 12% setelah dibandingkan dengan protein marker berat molekul protein tersebut terletak diantara dari 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa. Menurut Acris Antibody company (2010), bahwa eCG hasil tera laboratoris mempunyai spesifikasi dengan berat molekul 53 kDa Analysis by RP-HPLC, UV spectroscopy at 280 nm. Lyophilized eCG hanya stabil pada temperatur kamar selama 3 minggu seterusnya harus disimpan direfrigerator 2-8°C. Serum kuda bunting mempunyai kandungan 46.7% eCG dan mempunyai kaya akan molekul Sialic Acid (13.5%) (Gospodarowicz 1972).

Isolasi protein eCG dilakukan setelah itu didiamkan dalam lemari es selama 24 jam pada suhu 4°C. Penambahan larutan tersebut disesuaikan dengan volume endapan (1:1). Selanjutnya, dilakukan sentrifusi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Setelah itu dimasukkan ke dalam freezer selama lima menit. Pelet yang terbentuk kemudian ditambah 200 µl *buffer Tris-Cl*. Setelah isolat protein didapatkan, dilakukan *running SDS-PAGE* 12% sampai tampak pita-pita protein eCG yang terdapat pada gel (Aulanni'am, 2005).

Penelitian tahap awal untuk mengetahui karakteristik atau identitas protein eCG berdasarkan berat molekulnya. Metode yang digunakan adalah teknik SDS-PAGE 12% dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel dibandingkan dengan marker protein. Berat molekul yang tepat dapat

diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 65 kDa, 55 kDa dan 28 kDa.

Kecepatan Waktu Timbulnya Birahi

Waktu timbulnya birahi dihitung saat penyuntikan Prostaglandin F_{2α} yang ketiga sampai dengan munculnya gejala birahi (dalam jam). Pengamatan timbulnya birahi dilakukan dua kali sehari oleh peneliti (siang dan sore) serta dibantu oleh pihak peternak sebanyak tiga kali (pagi, malam dan dini hari).

Tabel 1. Kecepatan Waktu Timbulnya Birahi (jam) Setelah Hari ke-3 Penyuntikan Prostaglandin F_{2α}

Jenis dan Dosis ECG	N	Rataan (± SD)
(K) PG 600 600 IU	6	51,24 ^a ± 8,57
(P1) ECG Hasil produksi 150 IU	6	52,05 ^a ± 12,86
(P2) ECG Hasil produksi 300 IU	6	50,40 ^a ± 12,18
(P3) ECG Hasil produksi 600 IU	6	52,15 ^a ± 12,86

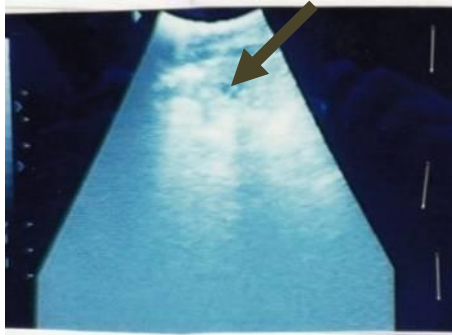
Keterangan : superskrip sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$)

Berdasarkan tabel diatas dapat diketahui pemberian ECG asal kuda lokal dengan ECG luar (PG 600) dengan menggunakan uji Anova terhadap kecepatan waktu timbulnya birahi secara statistik tidak terdapat perbedaan yang nyata ($p > 0,05$) diantara kelompok perlakuan.

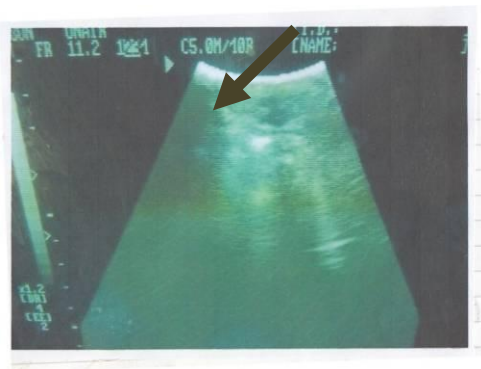
Folikel Pada Saat Sebelum dan Sesudah Birahi

Folikel pada ovarium ketika Pada Saat Sebelum dan Sesudah Birahi birahi

setelah hari ke-3 pemberian Prostaglandin $F_2\alpha$ dengan mengamati adanya folikel dominan dan folikel subordinat yang dipantau dengan USG.



Gambar 1. Folikel Subordinat dengan Ukuran < 5mm pada Sapi Madura



Gambar 2. Folikel Dominan Saat Timbulnya Birahi

Sinkronisasi estrus bertujuan meningkatkan jumlah sapi estrus dalam waktu bersamaan yang memungkinkan inseminasi secara serentak. Pengamatan tanda-tanda estrus dibutuhkan dalam menentukan waktu inseminasi yang tepat sehingga dapat meningkatkan efisiensi reproduksi.

Kecepatan waktu timbulnya birahi pada penelitian ini terhadap sapi-sapi Madura yang mendapatkan penyuntikan hormon ECG asal kuda lokal dan ECG®

yang kemudian diikuti dengan pemberian hormon Prostaglandin $F_2\alpha$ pada kelompok (K) ECG PG 600 600 IU adalah $51,24^a \pm 8,57$; (P1) ECG Kuda Lokal 600 IU adalah $52,15 \pm 12,86$; (P2) ECG Kuda Lokal 300 IU adalah $50,40^a \pm 12,18$; (P3) ECG Kuda Lokal 150 IU adalah $52,05^a \pm 12,86$. Kecepatan waktu timbulnya birahi tersebut ternyata tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) antara ECG® dengan ECG asal kuda lokal, hal ini menunjukkan bahwa ECG asal kuda lokal 125 IU dapat memendekkan awal timbulnya birahi daripada ECG®. Variasi timbulnya birahi tersebut kemungkinan besar merupakan refleksi perbedaan fase pertumbuhan folikel pada ovarium sehingga pada saat luteolisis setelah penyuntikan $PGF_2\alpha$ folikel-folikel ovulatorik yang ada tidak seragam kematangannya akhirnya dapat menghasilkan ovulasi pada saat yang berbeda-beda (Hariadi, 1997).

Penelitian ini sejalan menurut Herdis dkk, 2007 yang menyebutkan bahwa waktu kecepatan timbulnya birahi setelah penyuntikan Prostaglandin $F_2\alpha$ berkisar antara 36-72 jam dan pendapat Hafez *et al*, 2000 yang berkisar antara 48-72 jam.

Proses sinkronisasi dengan menggunakan preparat prostaglandin ($PGF_2\alpha$) akan menyebabkan regresi CL akibat luteolitik, secara alami prostaglandin ($PGF_2\alpha$) dilepaskan oleh uterus hewan yang tidak bunting pada hari ke-16 sampai ke-18 siklus yang berfungsi untuk menghancurkan CL. Timbulnya birahi akibat pemberian $PGF_2\alpha$ disebabkan lisisnya CL oleh kerja vasokonstriksi $PGF_2\alpha$ sehingga aliran darah menuju CL menurun secara drastis, akibatnya kadar progesteron yang dihasilkan oleh CL menurun, penurunan kadar progesteron ini akan merangsang hipofisa anterior melepaskan FSH dan LH yang bertanggung jawab

dalam proses folikulogenesis dan ovulasi sehingga terjadi pertumbuhan dan pematangan folikel yang menghasilkan estrogen yang mampu memanifestasikan gejala birahi. Kerja hormon estrogen untuk meningkatkan sensitivitas organ kelamin betina yang ditandai dengan perubahan pada vulva dan keluarnya lendir transparan (Mahaputra dan Mustofa, 2002)

Kesimpulan

Hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

Hasil produk *frozen dry eCG* disajikan dalam bentuk kering beku. Biopotensi antara eCG® dengan eCG asal kuda lokal terhadap kecepatan waktu timbulnya birahi yang terjadi tidak berbeda nyata. Biopotensi antara eCG® PG 600 dengan eCG asal kuda lokal

Daftar Pustaka

- Allen W.R. and R.M. Moor. 1972. The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J Reprod Fertil*, 29:313-316.
- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Laboratorium Biomolekular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang.
- Gospodarowic.D. 1972 Pregnant Mares Serum Gonadotrophin. The Salk Institute for Biological Studies Post Office Box 1809, San Diego, California 92112
- Hafez, E.S.E. 2000. 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, A. Samik, H.A.Hermadi dan P. Sianto. 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 H.A. 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.
- Lunenfeld B. 2004. Historical perspectives in gonadotrophin therapy. *Hum Reprod Update*, 10: 453-67.
- Mahaputra, L., dan L Mustafa. 2002. Kinerja Serum Sapi Birahi dan Kuda Birahi Sebagai Suplemen Media Maturasi Oosit Pada Fertilisasi *In Vitro* Sapi Madura. *Jurnal Biosains Pasca Sarjana* 4(3):113-117.
- Restiadi, T. I. 1999. Supplementasi Serum Kuda Bunting pada Media Maturasi dan Fertilisasi *In Vitro* Oosit Kambing

- Lokal. Tesis. Program Pascasarjana.
Universitas Airlangga. 1: 3-4.
- Schally A.V., A. Arimura, A.J. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T.W. Redding, R.M. Nair, L. Debeljuk and W.F. White. 1971. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*. 173: 1036-1038.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedure Statistika Jakarta. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Jakarta.
- Widjaja N.M.R. 2006. Pemisahan Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) dari serum kuda bunting serta uji Potensi Biologisnya. Desertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga.