

PEMERIKSAAN PROFIL HORMON PROGESTERON SELAMA SIKLUS ESTRUS TIKUS (*Rattus norvegicus*) BETINA MENGGUNAKAN PERANGKAT INFRAMERAH

*The Examination of Progesterone Hormone Profile on Female Rats (*Rattus norvegicus*) Throughout Estrous Cycle by Infrared Spectroscopy*

Luthfirda Sjahfirdi¹, Putri Krida Gita P.¹, Pudji Astuti², dan Hera Maheshwari³

¹Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Jakarta

²Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

E-mail: luthfirda@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan memperoleh profil fluktuasi kadar hormon ovari sepanjang siklus estrus. Sampel darah yang berasal dari sepuluh ekor tikus betina diambil selama tiga siklus estrus dan dianalisis menggunakan perangkat inframerah. Kadar progesteron selama tiga siklus memiliki kisaran 6-11 ng/ml pada masa estrus dan meningkat menjadi 32-49 ng/ml pada saat non-estrus.

Kata kunci: kawin inframerah, progesteron, siklus estrus, tikus betina

ABSTRACT

The aim of the study was to obtain hormonal fluctuated profile of ovarian hormones throughout estrous cycle. Blood samples from ten female rats were collected during three consecutive estrous cycles and analyzed by infrared spectroscopy. The absorbance values of functional groups of progesterone were converted to ng/ml ranging between 12.135-39.387 ng/ml for ketone; 7.995-35.702 ng/ml for metil; and 7.542-39.249 ng/ml for metil ketone. The progesterone level during three cycles ranging between 6-11 ng/ml on estrous cycle and 32-49 ng/ml on non estrous cycle.

Key words: infrared spectroscopy, progesterone, estrous cycle, female rat

PENDAHULUAN

Pemantauan siklus estrus berperan penting pada keberhasilan fertilisasi dan reproduksi untuk meningkatkan jumlah populasi hewan (Nalley *et al.*, 2011), khususnya hewan-hewan dengan status konservasi terancam punah (Maxim *et al.*, 2003). Dengan diketahui saat masa subur yang umum terjadi di pertengahan siklus, hewan betina dapat dikawinkan secara alami di penangkaran. Masa subur ditandai dengan dilepaskannya sel telur betina matang melalui peristiwa ovulasi (Sophia, 2003). Pada masa tersebut, hormon estrogen mencapai kadar maksimal dan kemudian menurun drastis. Setelah ovulasi terjadi, rendahnya kadar estrogen akan digantikan dengan mulai meningkatnya kadar progesteron. Peningkatan kadar progesteron menandakan ovulasi telah terjadi dan kadar progesteron akan mencapai puncaknya pada fase midluteal siklus. Fluktuasi kadar hormon-hormon tersebut merupakan respons terhadap bekerjanya hormon-hormon hipofisis pada organ ovari (Chapman *et al.*, 2004; Dewi, 2010).

Salah satu metode pemantauan siklus estrus adalah melalui pengukuran fluktuasi kadar hormon ovari sepanjang siklus, yaitu hormon estrogen dan progesteron. Pengukuran kadar hormon yang sering dilakukan adalah menggunakan metode *radioimmuno-assay* (RIA) dan *enzymeimmunoassay* (EIA) (Sacher dan McPerson, 2002; Robertson dan Williams, 2009). Kedua metode tersebut memiliki tingkat sensitivitas dan akurasi yang tinggi, meski memiliki beberapa kelemahan.

Untuk mengatasi kelemahan kedua metode tersebut, pada tahun terakhir, telah dicoba suatu metode dengan menggunakan perangkat inframerah untuk mendeteksi keberadaan suatu hormon dalam tubuh hewan. Melalui hewan uji tikus betina, dari spektrum inframerah diidentifikasi gugus fungsi spesifik yang merepresentasikan keberadaan suatu hormon dalam cairan tubuh (Sjahfirdi *et al.*, 2011). Spektrum yang diperoleh dapat diinterpretasikan menjadi kadar hormon pada kondisi estrus dan non-estrus (Smith, 1979).

Progesteron dianggap dapat mewakili teridentifikasinya peristiwa ovulasi. Progesteron hanya akan disekresikan melalui suatu badan yang terbentuk setelah ovulasi terjadi. Setelah ovulasi terjadi, kadar progesteron mulai meningkat, dan terus meningkat sampai mencapai jumlah maksimal (Chapman *et al.*, 2004; Dewi, 2010). Jika terjadi fertilisasi pada sel telur hasil ovulasi, maka kadar progesteron dipertahankan sampai kebuntingan terjadi. Sebaliknya, jika sel telur hasil ovulasi tidak difertilisasi, maka kadar progesteron menurun secara gradual, dan terus menurun sampai berakhirnya siklus (Nadjudin *et al.*, 2010). Kadar progesteron tetap rendah di awal siklus berikut sampai ovulasi terjadi lagi (Ward *et al.*, 2005).

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 10 ekor tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague-Dawley* berumur 2-3 bulan dengan berat badan berkisar antara 150-200 g.

Tikus diadaptasikan sampai berat badan tikus stabil pada kandang rumah rodensia (Setiawan, 2007; Nalley *et al.*, 2011) dan ditentukan fase-fase dalam siklus estrusnya menggunakan metode ulas vagina.

Metode Ulas Vagina

Pembuatan sediaan ulas vagina dilakukan untuk identifikasi dimulainya siklus estrus. Sampel diambil setiap hari pada pukul 09.00-11.00 WIB selama tiga siklus estrus berturut-turut. Cara pengambilan sampel menggunakan *cotton bud* yang dibasahi dengan larutan natrium klorida (NaCl), lalu dimasukkan ke dalam vagina tikus betina dengan sudut $\pm 45^\circ$ dan diulas sebanyak 1-2 kali putaran. Hasil ulasan dioleskan pada gelas objek dan dikeringanginkan pada suhu kamar. Pada sediaan ulas vagina dilakukan pewarnaan menggunakan Giemsa.

Sediaan dimasukkan ke dalam larutan alkohol absolut untuk difiksasi selama 3 menit, kemudian diangkat, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan. Selanjutnya, sediaan tersebut dimasukkan ke dalam larutan Giemsa selama 15 menit. Sediaan diangkat dan dibilas dengan air yang mengalir, kemudian dikeringanginkan.

Penentuan Siklus Estrus

Sediaan ulas vagina yang telah diwarnai ditentukan fase siklus estrusnya melalui identifikasi morfologi sel epitel. Sel epitel yang diamati adalah bentuk sel parabasal, sel intermediet, dan sel superfisial serta keberadaan leukosit yang berbeda-beda pada setiap fasenya. Penentuan awal siklus estrus adalah pada saat sediaan memperlihatkan sel superfisial yang mendominasi lapangan pandang, yang berarti hewan berada pada kondisi estrus (Ward *et al.*, 2005; Westwood, 2008).

Pengambilan Sampel Darah

Sampel darah diambil dengan metode *tail clipping*. Ekor yang akan dipotong dibersihkan dengan alkohol 70%, kemudian dipotong $\pm 1-2$ mm dari ujung ekor

dengan menggunakan gunting yang telah disterilkan (Weiss *et al.*, 2000). Darah yang keluar ditampung dalam *microtube* yang telah diberi *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) sebanyak 1 ml. Selanjutnya, dilakukan *recovery* pada bagian yang terluka dengan ditutup kapas kering agar mencegah terjadinya infeksi dan kapas ditahan dalam beberapa menit untuk menghentikan pendarahan. Selanjutnya, sampel yang telah didapat dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 8°C sampai analisis dilakukan.

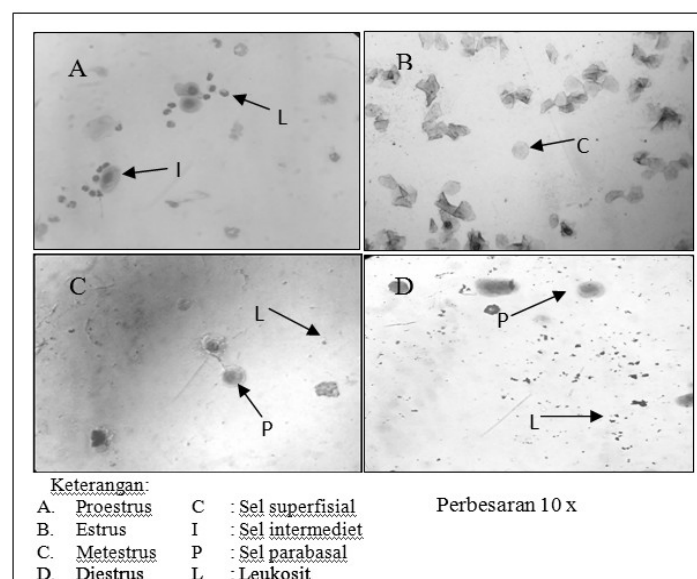
Analisis Hormon Progesteron

Analisis hormon progesteron dari sampel darah dilakukan dengan menggunakan perangkat inframerah *fourier transform infrared*. Inframerah dihidupkan pada saat kompartemen sampel dalam keadaan kosong. Komputer dan program *IR solution* dijalankan. Selanjutnya dilakukan pembuatan *blanko* dengan menempatkan *assembly cell* tanpa sampel pada kompartemen sampel inframerah. Analisis sampel kemudian dilakukan setelah spektrum inframerah dari *blanko* ditampilkan. Setelah diketahui nilai absorbansi gugus spesifik progesteron sepanjang tiga siklus estrus, selanjutnya nilai absorbansi tersebut direrata dengan faktor koreksi. Faktor koreksi tersebut ditentukan menggunakan nilai absorbansi gugus fungsi spesifik hemoglobin, yang merupakan suatu nilai yang bersifat tetap dalam darah dan keberadaannya tidak dipengaruhi masa estrus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metode ulas vagina digunakan untuk penentuan awal siklus estrus. Hasil mikrofotograf ulas vagina disajikan pada Gambar 1.

Masa estrus ditandai dengan banyaknya sel superfisial pada sediaan ulas vagina yang disajikan pada Gambar 1B. Banyaknya sel superfisial merupakan respons terhadap meningkatnya kadar estrogen



Gambar 1. Fotomikrograf ulas vagina selama siklus estrus tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague-Dawley*

menjelang ovulasi (Marcondes *et al.*, 2002). Hasil pengamatan menunjukkan enam dari sepuluh ekor tikus memperlihatkan siklus estrus normal yang berlangsung selama 4-5 hari. Keempat tikus yang tidak memperlihatkan siklus normal, yaitu T₇, T₈, T₉, dan T₁₀ mengalami fase non-estrus yang berkepanjangan, yaitu selama 192 jam atau sekitar 8 hari berturut-turut. Dari penelitian terdahulu, disebutkan bahwa fase estrus normal terjadi selama 24-30 jam atau sekitar 1 hari dan fase non-estrus selama 90 jam atau sekitar 4 hari dalam satu siklus (Nalley *et al.*, 2011). Terganggunya siklus estrus kemungkinan disebabkan tikus mengalami stres sehingga memengaruhi respons fisiologis.

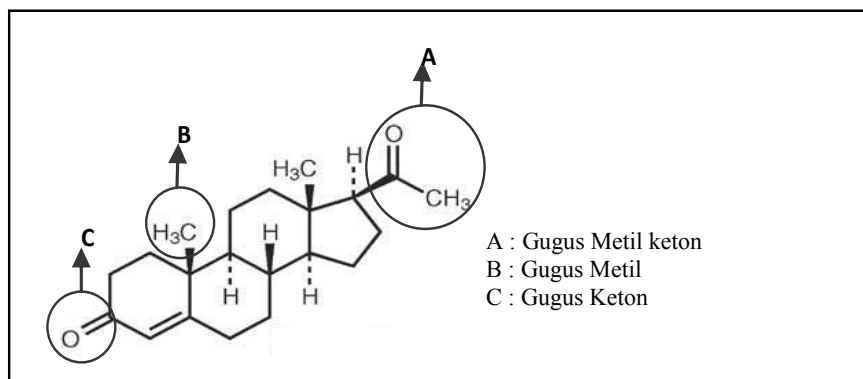
Analisis Hormon Progesteron melalui Perangkat Inframerah

Hasil analisis hormon progesteron sampel darah selama tiga siklus estrus berupa spektrum inframerah terdiri atas frekuensi atau bilangan gelombang (cm^{-1}) pada sumbu X, nilai absorbansi (%) pada sumbu Y, dan sebuah kurva yang terdapat sepanjang bilangan 400-4000 cm^{-1} . Identifikasi progesteron ditentukan berdasarkan gugus fungsi spesifiknya melalui spektrum hasil analisis inframerah. Gugus fungsi yang menandai keberadaan progesteron yaitu gugus keton, gugus metil, dan gugus metil keton (Gambar 2). Ketiga gugus fungsi tersebut dapat diidentifikasi pada bilangan gelombang tertentu. Gugus keton berada pada bilangan gelombang 1707-1726

cm^{-1} , gugus metil terdapat pada 1375-1383 cm^{-1} , dan gugus metil keton pada 1350-1369 cm^{-1} (Smith, 1979).

Penentuan terhadap gugus fungsi spesifik yang merepresentasikan hormon progesteron didapat melalui kuantifikasi puncak spektrum inframerah. Setelah masing-masing gugus fungsi diidentifikasi selanjutnya ditentukan nilai absorbansi masing-masing gugus fungsi. Untuk mempermudah analisis secara kuantitatif, maka spektrum yang diperoleh diubah ke dalam bentuk kumpulan data numerik.

Penanda gugus fungsi spesifik progesteron, yaitu keton berada pada bilangan gelombang 1726 cm^{-1} , metil pada 1375 cm^{-1} , dan metil keton pada 1350 cm^{-1} (Smith, 1979). Nilai absorbansi masing-masing gugus fungsi disajikan pada Tabel 1. Tabel 1 memperlihatkan nilai absorbansi pada siklus estrus ke-1 yang diperoleh dari puncak estrus sampai kondisi non-estrus tercapai. Pada puncak estrus, gugus keton, metil, dan metil keton memiliki nilai absorbansi masing-masing adalah 0,123; 0,436; dan 0,086%. Nilai absorbansi ini meningkat sampai kondisi non-estrus tercapai yaitu masing-masing menjadi 0,401; 0,097 dan 0,394%. Pada siklus estrus ke-2 nilai absorbansi pada puncak estrus untuk ketiga gugus fungsi tersebut masing-masing adalah 0,113; 0,446; dan 0,076% dan meningkat sampai mencapai kondisi non-estrus masing-masing menjadi 0,385; 0,067; dan 0,444%. Pada siklus estrus ke-3, nilai absorbansinya masing-masing adalah 0,162; 0,653%; dan 0,138 % pada



Gambar 2. Gugus fungsi spesifik progesteron (Sjahfirdi *et al.*, 2011)

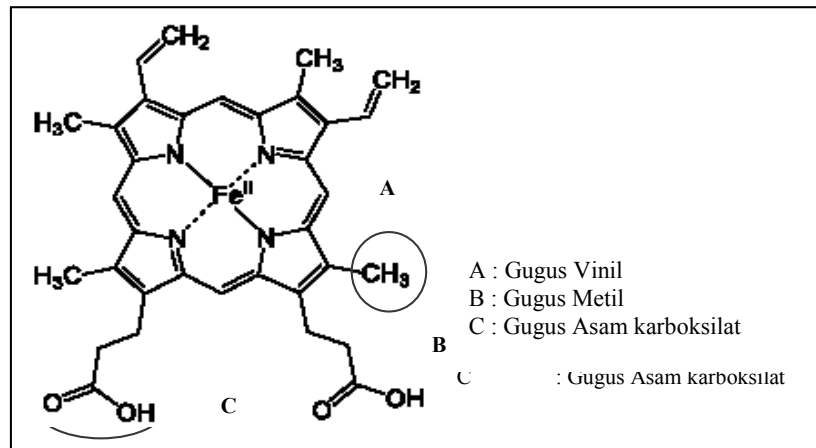
Tabel 1. Nilai absorbansi gugus fungsi spesifik progesteron selama siklus estrus

Tikus	Siklus Estrus ke I						Siklus Estrus ke II						Siklus Estrus ke III					
	Nilai absorbansi (%)																	
	Keton		Metil		Metil keton		Keton		Metil		Metil keton		Keton		Metil		Metil keton	
	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Min.	Min.	Min.
1	0,107	0,513	0,103	0,515	0,084	0,491	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0,24	0,416	0,223	0,457	0,202	0,421	0,120	0,374	0,109	0,413	0,098	0,328	0,142	0,629	0,104	0,415	0,084	0,604
3	0,16	0,588	0,011	0,651	0,138	0,603	0,152	0,653	0,140	0,680	0,125	0,653	0,182	0,676	0,171	0,693	0,154	0,665
4	0,131	-	0,065	0,070	0,061	0,153	0,142	0,370	0,006	0,008	0,003	0,383	-	-	-	-	-	-
5	0,025	0,334	0,018	0,035	0,006	0,341	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0,076	0,327	0,095	0,361	0,088	0,354	0,036	0,385	0,050	0,438	0,043	0,411	-	-	-	-	-	-
Rerata	0,123	0,436	0,086	0,401	0,097	0,394	0,113	0,446	0,076	0,385	0,067	0,444	0,162	0,653	0,138	0,554	0,119	0,635
SD	0,074	0,114	0,077	0,196	0,067	0,153	0,053	0,138	0,060	0,279	0,055	0,144	0,028	0,033	0,047	0,197	0,049	0,043

Keterangan :

Min : Nilai absorbansi saat estrus

Maks : Nilai absorbansi saat nonestrus



Gambar 3. Gugus fungsi spesifik hemoglobin (Nalley *et al.*, 2011)

puncak estrus dan meningkat masing-masing menjadi 0,554; 0,119; dan 0,635% ketika non-estrus.

Selanjutnya nilai absorbansi tersebut direrata dengan faktor koreksi. Faktor koreksi tersebut ditentukan menggunakan nilai absorbansi gugus fungsi spesifik hemoglobin (Hb), yang merupakan suatu nilai yang bersifat tetap dalam darah dan keberadaannya tidak dipengaruhi masa estrus. Gugus fungsi hemoglobin (Gambar 3) juga diidentifikasi berdasarkan puncak yang dihasilkan dari spektrum inframerah. Penanda utama untuk mengidentifikasi hemoglobin dari spektrum inframerah adalah gugus fungsi asam karboksilat (Smith, 1979). Asam karboksilat tersebut tidak terdapat pada progesteron dan dapat diidentifikasi pada bilangan gelombang 1396-1440 cm^{-1} pada spektrum inframerah. Berdasarkan hasil dari perhitungan rerata pada bilangan gelombang asam karboksilat, bahwa bilangan gelombang 1425 cm^{-1} dipilih sebagai penanda hemoglobin, karena memiliki rerata nilai absorbansi kecil sepanjang siklus estrus dengan standar deviasi terkecil (Tabel 2).

Tabel 2. Rerata nilai absorbansi hemoglobin

Tikus	Nilai absorbansi (%)
1	0,234
2	0,337
3	0,361
4	0,115
5	0,152
6	0,347
Rerata	0,258
SD	0,107

Tabel 3. Nilai absorbansi gugus fungsi spesifik progesteron

Siklus	Nilai Absorbansi (dalam % Hb)					
	Keton		Metil		Metil keton	
	Min.	Maks.	Min.	Maks.	Min.	Maks.
I	0,477	1,690	0,333	1,554	0,376	1,527
II	0,438	1,729	0,295	1,492	0,260	1,721
III	0,628	2,531	0,535	2,147	0,461	2,461

Dengan demikian selanjutnya absorbansi inframerah masing-masing gugus fungsi spesifik dikoreksi dengan absorbansi gugus fungsi spesifik hemoglobin, yaitu asam karboksilat (COOH), pada bilangan gelombang 1425 cm^{-1} sebesar 0,258 %.

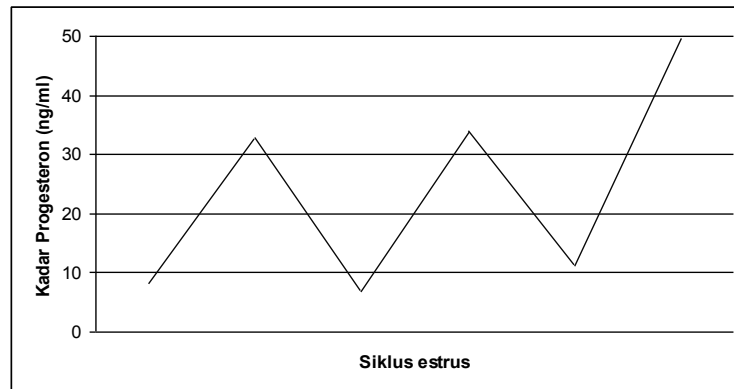
Nilai absorbansi gugus spesifik progesteron di setiap siklus yang telah dikoreksi oleh faktor koreksi Hb disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3 menunjukkan nilai absorbansi masing-masing gugus fungsi selama tiga siklus yang telah dikoreksi oleh nilai absorbansi hemoglobin. Absorbansi tersebut memberikan gambaran yang berfluktuasi yaitu bernilai minimal ketika dimulainya kondisi estrus dan mencapai nilai maksimal ketika kondisi non-estrus (Ward *et al.*, 2005).

Nilai-nilai pada Tabel 3 dikonversi menjadi kadar dalam ng/ml menggunakan konversi 1% progesteron ekuivalen dengan konsentrasi progesteron 20,625 ng/ml (Sjahfirdi *et al.*, 2011). Nilai-nilai tersebut ditunjukkan pada Tabel 4 berupa kadar hormon progesteron sepanjang 3 siklus melalui 3 gugus fungsi spesifik yang merepresentasikan hormon progesteron. Gambaran kadar progesteron selama siklus estrus disajikan pada Gambar 4. Kadar progesteron selama estrus rendah, dan makin meningkat sampai masa non-estrus tercapai (Maeda *et al.*, 2000). Perbandingan konsentrasi progesteron saat estrus dan non-estrus berkisar empat kalinya. Dengan demikian, gambaran profil hormon progesteron sepanjang siklus estrus tikus dapat diperoleh sehingga penelitian ini dapat melengkapi data kadar hormon reproduksi sepanjang siklus estrus tikus.

Tabel 4. Kadar progesteron yang diperoleh dari rerata kadar ketiga gugus fungsi spesifiknya

Siklus	Rerata absorbansi ketiga gugus fungsi (keton, metil dan metil keton), %		Kadar progesteron (ng/ml)	
	Estrus	Non-estrus	Estrus	Non-estrus
I	0,395	1,590	8,150	32,794
II	0,331	1,647	6,827	33,969
III	0,541	2,380	11,158	49,088

**Gambar 4.** Konsentrasi progesteron selama siklus estrus tikus (*Rattus norvegicus*) betina galur *Sprague-Dawley*

KESIMPULAN

Fluktuasi kadar progesteron sepanjang siklus memberi gambaran lengkap profil hormon progesteron. Metode inframerah dapat memberikan profil kadar progesteron sepanjang siklus estrus melalui gugus-gugus fungsi spesifiknya yaitu yaitu gugus keton ($-\text{CO}$) pada 1726 cm^{-1} , metil ($-\text{CH}_3$) 1375 cm^{-1} , dan metil keton ($-\text{COCH}_3$) 1350 cm^{-1} . Kadar progesteron selama tiga siklus memiliki kisaran 6-11 ng/ml pada masa estrus dan meningkat menjadi 32-49 ng/ml pada saat non-estrus. Kadar pada saat non-estrus meningkat empat kali dibandingkan pada masa estrus.

DAFTAR PUSTAKA

- Champbell, A.N., J.B. Reece, and L.G. Mitchell. 2004. **Biology**. W. Manalu (Penterjemah). Edisi ke-5. Erlangga, Jakarta.
- Dewi, D.S.K. 2010. Identifikasi Protein Early Pregnancy Factor (EPF) dari Kotiledon Sapi Bunting. **Skripsi**. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Maeda, K., S. Ohkura, and H. Tsukamura. 2000. Physiology of Reproduction. In **The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat**. Krinke, G.J. (ed.). Academic Press, London.
- Marcondes, F.K., F.J. Bianchi, and A.P. Tanno. 2002. Determination of the estrous cyclephase of rats: some helpful considerations. **J. Brazilian Archiv. Biol. Technol.** 4(A):600-614.
- Maxim, S., Hadad, dan S. Sitorus. 2003. Konservasi keanekaragaman hayati di Indonesia. **The Synergos Institute** 6:1-7.
- Nadjamudin, Rusdin, Sriyanto, Amrozi, S. Agungpriyono, dan T.L. Yusuf. 2010. Penentuan siklus estrus pada kancil (*Tragulus javanicus*) berdasarkan perubahan sitologi vagina. **Jurnal Veteriner** 11:81-86.
- Nalley, W.M.M., R. Handarini, M. Rizal, R.I. Arifiantini, T.L. Yusuf, dan B. Purwantara. 2011. Determination of the estrous cycle based on vaginal cytology and hormone profile in timor hind. **Jurnal Veteriner** 12(2):98-106.
- Robertson, D. and G.H. Williams. 2009. **Clinical and Translational Science Principles of Human Research**. Elsevier Inc., New York.
- Sacher, R.A. and R.A. McPerson. 2002. **Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium**. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Setiawan, I.M. 2007. Pemeriksaan enzyme-linked immunosorbent assay untuk diagnosis leptospirosis. **Ebers Papyrus** 13:125-136.
- Sjahfirdi, L., A. Septian, H. Maheshwari, P. Astuti, F. D. Suyatna, and M. Nasikin. 2011. Determination of estrous period in female rats (*Rattus norvegicus*) by fourier transform infrared spectroscopy through identification of reproductive hormone in blood samples. **World Appl. Sci. J.** 14(4):539-545.
- Smith, A.L. 1979. **Applied Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Techniques, and Analytical Problem-Solving**. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Sophia, R.A. 2003. Uji Efek Diuretic Suspensi Simplisia Daun Sambilot (*Andrographis Paniculata* ness) terhadap Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Betina Galur Sprague-Dawley. **Skripsi**. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Jakarta.
- Ward, J.P.T., R.W. Clarke and R.W.A. Linden. 2005. **Physiology at a Glance**. Blackwell Publishing, USA.
- Weiss, J., G.R. Taylor, F. Zimmermann, and K. Nebendahl. 2000. Collection of Body Fluids. In **The Handbook of Experimental Animals: The Laboratory Rat**. Krinke, G.J. (ed.). Academic Press, London.
- Westwood, F.R. 2008. The female rat reproduction cycle: A practical histological guide to staging. **Toxicol. Pathol.** 36:375-384.