

PREPARASI SAMPEL UNTUK PENGUKURAN HORMON PROGESTERON SAPI PADA APLIKASI TEKNIK RADIOIMMUNOASSAY

Nuning Duria¹, Budi Santoso¹, Nuniek Lelaningtias², Wiranto Budi Santoso¹

¹ PRPN-BATAN, Kawasan Puspiptek, Gedung 71 Lt 2, Serpong, Tangerang, Banten 15310

² PATIR-BATAN, Kawasan BATAN Pasar Jumat Gedung 47 Lt 2, Pasar Jumat, Jakarta Selatan 12070

ABSTRAK.

PREPARASI SAMPEL UNTUK PENGUKURAN HORMON PROGESTERON SAPI PADA APLIKASI TEKNIK RADIOIMMUNOASSAY. Telah dilakukan preparasi sampel untuk mengukur progesteron sapi dengan menggunakan teknik RIA. Preparasi sampel meliputi persiapan pengambilan sampel berupa sampel susu sapi yang telah dilakukan inseminasi buatan (IB) setelah hari ke 0, ke 11 dan hari ke 21 dari IB tersebut. Kemudian dilakukan pembuatan standar progesteron berupa susu segar atau susu skim (bebas lemak) yang telah dihilangkan progesteronnya dan melalui serangkaian proses kimia. Terakhir adalah persiapan pengerjaan sampel dengan menggunakan kit RIA I¹²⁵. Dengan persiapan sampel susu ini diharapkan sampel dapat dicacah dengan pencacah RIA sehingga konsentrasi hormon progesteron dapat diketahui dengan tepat. Adapun tujuan pengukuran hormon progesteron sapi yaitu untuk mengetahui apakah inseminasi buatan yang dilakukan berhasil atau tidak.

Kata kunci: RIA, Progesteron, sample susu

ABSTRACT.

SAMPLE PREPARATION FOR MEASURING COW'S PROGESTERONE IN RADIOIMMUNOASSAY TECHNIQUE APPLICATION. Sample preparation for measuring cow's progesterone in radioimmunoassay technique application has been done. Preparation includes the preparation of samples of cow's milk samples that has been carried out artificial insemination on day 0, 11 and 21. Then the standard making of progesterone in the form of fresh milk or skim milk (non fat) that has been removed its progesterone and through a series of chemical processes. The last is the preparation work on samples using the RIA kit I¹²⁵. With this milk samples preparation, samples can be counted using RIA counter so that concentration of progesterone hormone can be determined accurately. The purpose of cow's progesterone hormone measurement is to know if the artificial insemination is successful or not

Keywords: RIA, Progesterone, milk samples

1. PENDAHULUAN

Terjadinya kebuntingan pada seekor sapi dapat diketahui dari konsentrasi hormon progesteron pada sapi tersebut. Hormon progesteron merupakan hormon reproduksi yang diproduksi *Corpus Luteum* (CL) dan plasenta dalam jumlah banyak pada sapi bunting. Hormon ini memiliki berat molekul 300-400 dan termasuk ke dalam kelompok hormon steroid^[1].

Latar belakang yang menjadi pertimbangan preparasi sampel ini adalah untuk menguji kadar hormon

progesteron pada sapi untuk mengetahui apakah inseminasi yang dilakukan baik secara alami maupun secara inseminasi buatan berhasil atau tidak. Kepastian kebuntingan tersebut diperlukan agar proses inseminasi dapat segera diulang kembali jika proses sebelumnya gagal tanpa menunggu waktu yang lama.

Pengukuran konsentrasi progesteron ini dapat dilakukan dengan menggunakan teknik *Radioimmunoassay* (RIA). Teknik RIA, yang diperkenalkan oleh Berson dan Yalow, merupakan teknik yang sangat

sensitif untuk mengukur konsentrasi hormon dalam darah tanpa perlu melakukan bioassay^[2]. Untuk pengukuran konsentrasi hormon progesteron sapi dapat dilakukan selain dengan sampel darah juga melalui sampel air susu sapi^[3]. Sampel air susu lebih menguntungkan karena pengambilan sampel yang lebih mudah dibandingkan dengan pengambilan sampel darah. Selain itu kadar progesteron dalam air susu lebih tinggi dibandingkan pada sampel darah.

Aplikasi teknik RIA dalam penentuan konsentrasi hormon progesteron sapi memerlukan teknik preparasi sampel yang baik. Preparasi sampel sangat menentukan hasil pencacahan yang dilakukan dengan menggunakan teknik RIA. Preparasi dimulai dari pengambilan sampel susu hingga sampel siap untuk dicacah menggunakan pencacah RIA. Dengan preparasi sampel susu ini diharapkan hasil perhitungan konsentrasi hormon progesteron susu sapi dapat lebih akurat.

2. TEORI

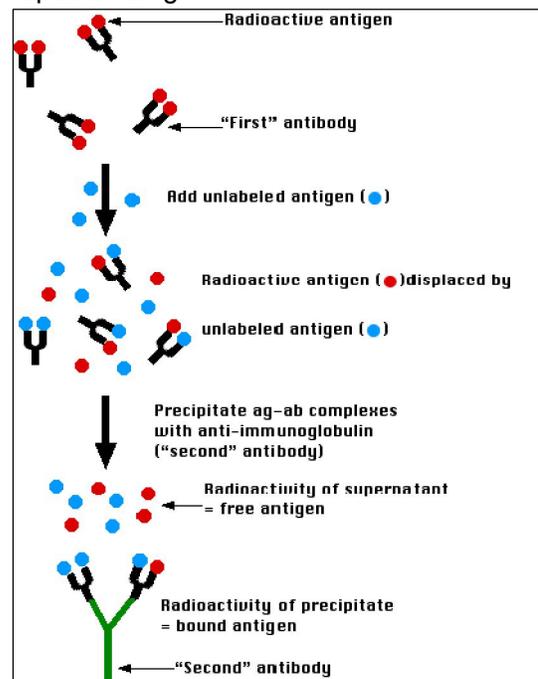
2.1 Teknik Radioimmunoassay (RIA)

RIA merupakan teknik analisa secara in vitro dengan menggunakan perunut radioaktif yang didasarkan pada prinsip imunologi^[2]. Hasil analisis menggunakan teknik RIA sangat peka karena menggunakan zat radioaktif yang dapat dideteksi dengan alat yang mempunyai kepekaan yang tinggi, serta spesifik karena berdasarkan pada reaksi imunologi dimana terjadi ikatan spesifik antara antibodi dengan antigen tertentu saja^[2]. Teknik RIA banyak digunakan dalam analisis zat-zat yang ada dalam contoh biologis seperti cairan tubuh (serum, urine) atau zat yang mempunyai kadar rendah yang dengan teknik lain sulit ditentukan.

Untuk melakukan teknik RIA dapat dilihat dari gambar 1. Disini suatu kuantitas yang diketahui dari antigen dibuat menjadi radioaktif dengan diberi

label isotop radioaktif gamma dari iodine yang dilekatkan pada tirosin. Antigen berlabel radioaktif ini lalu dicampur dengan jumlah yang diketahui dari antibodi untuk antigen tersebut, dan sebagai hasilnya keduanya terikat secara kimia satu dengan yang lainnya. Lalu suatu sampel serum dari pasien berisi kuantitas yang tidak diketahui dengan antigen yang sama ditambahkan. Hal ini mengakibatkan antigen tak berlabel (dingin) dari serum berkompetisi dengan antigen berlabel radioaktif (panas) untuk ikatan antibodi.

Konsentrasi antigen dingin meningkat, lebih banyak mengikat ke antibodi, menggeser varian berlabel radiasi dan mengurangi rasio dari ikatan antibodi-antigen berlabel radiasi, untuk membebaskan antigen berlabel radiasi. Ikatan antigen lalu dipisahkan dari yang tak terikat, dan radiaktivitas dari antigen bebas yang tinggal dalam supernatant (mengambang dipermukaan) diukur. Dengan menggunakan standar suatu kurva ikatan dapat dibuat sehingga jumlah antigen pada serum pasien dapat dihitung.^[2]



Gambar 1. Prinsip dasar teknik radioimmunoassay (RIA)^[2]

2.2 Kit RIA ¹²⁵I Progesteron

Sistem pengujian ¹²⁵I Progesteron menyediakan penentuan kuantitatif in vitro dari progesteron dalam serum manusia atau plasma. Progesteron dapat diuji dalam kisar 0-120 nmol/l (0-37.7 ng/ml) menggunakan 50 ul sampel serum. Setiap kit berisi bahan yang cukup untuk 100 tabung pengujian, mengijinkan pembentukan satu kurva standar dan pengujian 41 sampel yang tidak diketahui dan satu kontrol secara duplikat

Pengujian progesteron ini didasarkan pada kompetisi antara progesteron tak berlabel dan jumlah yang tetap dari ¹²⁵I Progesteron berlabel untuk jumlah yang terbatas dari ikatan pada Progesteron antibodi spesifik. Hal ini memungkinkan untuk bereaksi jumlah yang tetap dari pelacak dan antibodi dengan jumlah yang berbeda dari ligan tak berlabel, maka jumlah dari pelacak yang terikat oleh antibodi akan berbanding terbalik terhadap konsentrasi ligan tak berlabel. Dengan penambahan *Magnetizable Immunosorbent* (MIS), maka kompleks antigen-antibodi terikat pada partikel padat, yang kemudian dipisahkan oleh sedimentasi magnetik atau dengan centrifuge. Kemudian menghitung radioaktivitas dari fasa padat akan menghasilkan suatu kurva standard dan sampel dapat dikuantisasi^[4].

3. TATAKERJA (BAHAN DAN METODE)

Hal pertama yang dilakukan sebelum dilakukan pengambilan sampel adalah mencatat riwayat ternak tersebut. Kemudian pengumpulan sampel susu sapi dilakukan oleh petugas Inseminasi buatan. Sampel susu disimpan dalam kontainer berpendingin. Pembuatan standar progesteron meliputi penyiapan bahan kimia dan alat-alatnya lalu melakukan penimbangan, pengukuran dan membuat beberapa larutan. Untuk

pengerjaan sampel memerlukan alat-alat seperti vortex mix untuk mencampur tracer dan antiserum. Alat *centrifuge* digunakan untuk memisahkan lemak dari susu dan pada proses pemisahan fraksi ikatan dalam teknik RIA.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengambilan Sampel

Sampling susu adalah pengambilan susu sebagai contoh dari sapi yang akan diukur kadar hormon progesteronnya. Adapun sampling susu dilakukan oleh petugas IB. Hasilnya kemudian dikirim ke laboratorium RIA, disertai sejarah ternak. Pengambilan sampel susu dilakukan pada hari ke 0, 11 dan 21 hari setelah dilakukan IB atau kawin alami. Air susu diperah sebanyak ± 10 cc dan langsung dimasukkan ke dalam tabung sampel yang sudah diberi bahan pengawet (*Sodium Azide*). Kemudian tabung diberi label dan selanjutnya disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C. Pengiriman sampel susu ke laboratorium RIA menggunakan kotak pendingin berisi es^[5].



Gambar 2. Pengambilan sampel susu



Gambar 3. Sampel susu didinginkan dengan es saat pengiriman sampel ke laboratorium

4.2 Persiapan Sampel

Air susu diperah sebanyak ± 10 cc dalam tabung sampel yang sudah diberi bahan pengawet (*Sodium Azide*) disentrifugasi pada 2000 rpm selama 15 menit pada 4°C atau suhu kamar. Bila disentrifugasi pada suhu kamar maka susu dimasukkan ke dalam kulkas selama 15 menit untuk mengeraskan lapisan lemak. Lemak dipisahkan dari susu dengan menggunakan sendok. Susu skim (bebas lemak) dipindahkan ke gelas penyimpanan dengan menggunakan pipet pasteur. Sampel susu dapat disimpan pada suhu 4°C^[5].



Gambar 4. Penyimpanan sampel susu dalam refrigerator

4.3 Pembuatan Standar Progesteron

Standar yang digunakan pada metode RIA untuk mengukur progesteron dalam susu dari ternak harus disiapkan dengan menggunakan susu yang tak mengandung progesteron. Susu yang digunakan adalah susu segar atau susu bubuk yang dicairkan kembali. Progesteron yang terkandung dalam susu dapat dipisahkan dengan menggunakan karbon aktif.

- Pembuatan susu bebas progesteron Mula-mula susu segar sebanyak 2 L dari sapi dicentrifuge selama 15 menit pada 3000 rpm dan suhu 4°C. Lapisan lemak dipisahkan. Bila menggunakan susu skim (bebas lemak) komersial maka susu bubuk diencerkan hingga 2 L sesuai

petunjuk. Air yang digunakan berkadar nanopure. Kemudian bahan kimia dan alat-alat yang diperlukan disiapkan dan ditimbang, kemudian membuat larutan A, larutan B dan larutan C. Terakhir menyiapkan standar dengan berbagai konsentrasi.

- Larutan A : Progesteron dilarutkan dalam 100 ml etanol untuk mendapatkan konsentrasi 10 mM
- Larutan B : Larutan A sebanyak 0.1 ml dipipet ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol hingga pada bagian yang bertanda untuk memperoleh konsentrasi 100 μ M
- Larutan C : Larutan B sebanyak 1 ml dipipet ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambahkan etanol hingga pada bagian yang bertanda untuk memperoleh konsentrasi 10Mm
- Dari larutan C dipipet sebanyak 0,025; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40; 0,80 ml ke dalam botol Erlenmeyer 500 ml. Larutan pengencer etanol kemudian dievaporasikan di dalam laminar air flow. Setelah kering ditambahkan susu bebas progesteron sebanyak 200 ml untuk diperoleh konsentrasi progesteron 1,25; 2,50; 5,00; 10,00; 20,00; 40,00 nM dan dikocok. Larutan standar progesteron siap untuk digunakan^[6].



Gambar 5. Standar Progesteron yang diperoleh (6 buah)

4.4 Persiapan Pengerjaan Sampel

Kit RIA ¹²⁵I progesteron merupakan reagen yang terdiri dari satu tabung pelacak (tracer), enam tabung standar, satu tabung antiserum, satu tabung kontrol serum dan satu botol

magnetic immunosorbent (mis). Pengerjaan sampelnya terdiri dari langkah-langkah berikut :

1. Semua reagen ditimbang ke temperatur ruang
2. Tabung-tabung yang ada diberi label.
3. Reagen sebanyak 50 uL setiap sampel dan setiap standar dimasukkan ke dalam tabung
4. Ditambahkan 100 uL tracer (I^{125}) dan 100 uL antiserum kemasing-masing tabung
5. Di mixer menggunakan vortex mixer (2-5 detik) dan didiamkan dalam suhu kamar (inkubasi) selama 2 jam
6. Ditambahkan 500 uL Magnetic Immunosorbent(MIS), divortex lalu diinkubasi selama 15 menit
7. Dilakukan centrifuge selama 15 menit dengan kecepatan 1500 rpm
8. Buang cairan dari masing-masing tabung
9. Siap dilakukan pencacahan (counting) masing-masing tabung menggunakan alat RIA^[4].



Gambar 6.a. Tabung MIS, Antiserum dan Tracer



Gambar 6.b. Alat vortex mix



Gambar 6.c Tabung standard Dan sampel



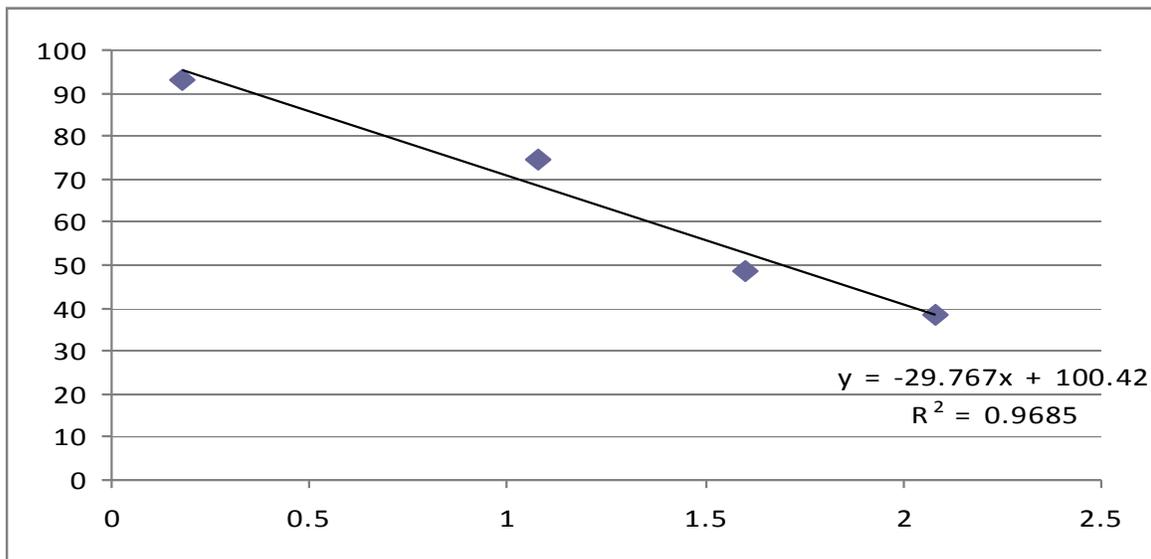
Gambar 6.d. Alat centrifuge

4.5 Pengukuran progesteron dengan menggunakan pencacah RIA.

Pengukuran standar (6 buah, duplo), sample (47 buah, duplo), dan blank (1 buah, duplo) dengan total 108 tabung dilakukan menggunakan pencacah RIA di Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi-BATAN..



Gambar 7. Pengukuran dengan pencacah RIA



Gambar 8. Kurva standar hasil pencacahan dengan pencacah RIA

Pada proses pengambilan sampel harus diperhatikan, bahwa sampel yang diambil agar tidak rusak maka harus diberi pengawet dan di simpan dalam kotak pendingin pada saat pengiriman sampel ke lab RIA. Sampel susu harus dipisahkan dari lemak dan untuk pembuatan standar progesteron, dibuat standar dengan berbagai konsentrasi.

Kegiatan pengerjaan sampel menggunakan Kit RIA ^{125}I Progesteron, dilakukan pemipetan dengan benar terhadap sampel dan standar yang ada, kemudian melakukan pencampuran dengan vortex mixer, melakukan inkubasi serta penambahan *magnetic Immunosorbent*. Setelah sampel dan standar siap kemudian dilakukan

pencacahan menggunakan pencacah RIA.

5. KESIMPULAN

Untuk mengetahui kebuntingan sapi dapat dilakukan dengan mengukur konsentrasi hormon progesteronnya. Sebelum dilakukan pengukuran hormon progesteron diperlukan preparasi sampel yang baik. Teknik RIA dapat digunakan untuk pengukuran konsentrasi hormon progesteron sapi. Keberhasilan aplikasi teknik RIA ditentukan oleh preparasi sampel yang akan dicacah menggunakan pencacah RIA

Keberhasilan preparasi sample di tentukan antara lain;Pencatatan data (riwayat) sapi, penandaan (labelling) tabung, adanya pengawet (sodium azide) disetiap tabung sampel, pastikan sampel benar-benar bebas lemak, teknik penyimpanan dan tranportasi yang baik sehingga terjaga dari kerusakan serta teknik pippeting yang teliti pada saat pengerjaan sampel.

6. UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih pada Kementerian Riset dan Teknologi yang telah mendanai kegiatan ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala PRPN dan Kepala PATIR yang telah memberikan izin untuk menggunakan fasilitas serta peralatan dalam kegiatan ini. Tak lupa penulis juga mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu pelaksanaan kegiatan ini, terutama Bapak Totti Tjiptosumirat, para peternak sapi perah, pengurus KUD Bayongbong, dan Kantor Dinas Peternakan Garut.

7. DAFTAR PUSTAKA

[1]. DARWATI S, Prinsip Dasar Radioimmunoassay, Aplikasi Teknik Ria Progesteron Untuk Perbaikan Kinerja Reproduksi Susu Perah Di Kabupaten Garut,19-20 Juli 2005

- [2]. FAO-IAEA PROGRAM, Prosedur Pembuatan Standar Progesteron Dalam Susu
- [3]. IAEA REGIONAL TECHNICAL COOPERATION PROJECT IN AFRICA, Application of RIA in Improving The Reproductive Management of Smallholder Dairy Cattle, September 2007
- [4]. PROGESTERONE^[125I] RIA KIT, RK-460MACE040501
- [5]. TJIPTOSUMIRAT, T. dan TUASIKAL, B. J.; Prosedur Sampling Susu Untuk Ria Progesteron, disampaikan pada Pelatihan Aplikasi Teknik RIA Progesteron Untuk Perbaikan Kinerja Reproduksi Sapi Perah di Kabupaten Garut, 19-20 Juli 2005
- [6]. WIKIPEDIA, 2010, "Radioimmunoassay" Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Radioimmunoassay>, diakses 15 – 11- 2010