

Hubungan Kadar Progesteron pada Fase Awal Luteal dengan Kematian Embrio pada Sapi Aceh

(Correlation between progesterone levels in early luteal phase and embryonic death in Aceh cattle)

Budianto Panjaitan¹, Citra Chyntia Helwana¹, Nellita Meutia², Yusmadi²,
Tongku Nizwan Siregar¹, Dasrul¹, dan Teuku Armansyah TR¹

¹Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

²Balai Pembibitan Ternak Unggul dan Hijauan Pakan Ternak Indrapuri

ABSTRAK Progesteron merupakan hormon yang berperan penting dalam proses pemeliharaan kebuntingan dan dihasilkan oleh corpus luteum. Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan antara kadar hormon progesteron pada fase awal luteal dengan kematian embrio pada sapi Aceh. Dalam penelitian ini digunakan empat ekor sapi betina dewasa berumur 3-5 tahun, bobot badan 150-250 kg, sehat secara klinis, dan memiliki reproduksi normal. Sapi disinkronisasi menggunakan 5 ml prostaglandin F2 alfa (PGF2 α) dengan pola penyuntikan ganda berinterval 11 hari. Koleksi sampel darah untuk pengukuran konsentrasi progesteron dilakukan pada hari ke-5, 6, dan 7 pasca inseminasi. Pengukuran konsentrasi progesteron dilakukan

menggunakan metode *enzymelinked-immunoassay* (ELISA), pemeriksaan kebuntingan dan kematian embrio menggunakan metode transrektal ultrasonografi pada hari ke-25 pasca inseminasi. Pemeriksaan diulang setiap 10 hari sampai hari ke-55 pasca inseminasi. Puncak sekresi progesteron pada sapi bunting dengan embrio yang bertahan hidup terdapat pada hari ke-7 (2,082 ng/ml), pada sapi *Late Embryonic Mortality* (LEM) di hari ke-5 (8,209 ng/ml) dan pada sapi tidak bunting di hari ke-7 (3,051 \pm 1,157 ng/ml). Sekresi progesteron sapi LEM pada hari ke-5 sampai dengan ke-7 cenderung menurun sedangkan pada sapi yang bertahan hidup cenderung meningkat.

Kata kunci: Sapi Aceh, progesteron, kematian embrio, ELISA, USG

ABSTRACT. Progesterone is an important hormone that functions to maintain pregnancy and is produced by the corpus luteum. The aim of this study was to see a correlation between progesterone and the incidence of embryonic death in Aceh cattle. This study used four adult female cows, 3-5 years old, 150-250 kg body weight, clinically healthy, and have a normal reproduction. The synchronized with 5 ml prostaglandin F2 alfa hormone, and double injection pattern with 11-day intervals. The blood was collected for progesterone measurements on 5th, 6th, 7th day post artificial insemination. Measurement of progesterone concentration

was carried out using an enzymelinked-immunoassay (ELISA), while pregnancy and embryo mortality was performed using the trans-rectal ultrasonography method on the 25th day after insemination. The examination was repeated every 10 days until day 55th after insemination. Progesterone secretion peaks in pregnant cows were on day 7th (2.082 ng/ml), in cattle Late Embryonic Mortality (LEM) on day 5th (8.209 ng/ml) and in cattle not pregnant on day 7th (3.051 \pm 1.157 ng/ml). The pattern of LEM progesterone secretion on days 5th to 7th tends to decrease while those that survive tend to increase.

Keywords: Aceh cattle, progesterone, embryonic death, ELISA, USG

PENDAHULUAN

Kematian embrio terjadi sebelum hari ke-42 kebuntingan ketika embrio telah mengalami diferensiasi dan implantasi. Kematian embrio dibagi menjadi dua klasifikasi berdasarkan waktu kematian yaitu early embryo mortality (EEM), yang terjadi sampai hari ke-27 dan late embryo mortality

2019 Jurnal Agripet: Vol (19). No. 2: 107-112

(LEM), yang terjadi pada hari ke-28 sampai ke-42 (Humbolt, 2001). Umumnya kematian embrio dini disebabkan oleh kelainan genetik, faktor infeksi, gangguan saluran reproduksi, dan gangguan hormon (Wawo, 2014).

Gangguan hormon yang bertanggung jawab terhadap terjadinya kematian embrio dan pemeliharaan kebuntingan adalah hormon progesteron. Progesteron merupakan hormon steroid yang disekresikan oleh corpus luteum,

Corresponding author: budi@unsyiah.ac.id
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v19i2.14881>

plasenta, dan kelenjar adrenal (Hafez, 2000). Progesteron berperan penting dalam pemeliharaan kebuntingan terutama pada tahap awal kebuntingan (Lestari, 2006). Rendahnya kadar hormon progesteron dapat menyebabkan kematian embrio (Setiawan *et al.*, 2017). Setelah ovulasi kadar progesteron mulai meningkat dan terus meningkat sampai mencapai jumlah maksimal (Hafez, 2000). 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 (Nadjamudin *et al.*, 2010).

Fenomena yang menarik dari konsentrasi progesteron sapi Aceh adalah konsentrasi puncak yang hanya berkisar $1,94 \pm 0,1$ ng/ml pada hari ke-10-12 siklus (Siregar *et al.*, 2016). Konsentrasi ini relatif lebih rendah dibandingkan dengan konsentrasi progesteron puncak pada sapi lain. Pada sapi Punganur konsentrasi puncak dicapai pada hari ke-15 dengan konsentrasi progesteron mencapai 10,66 ng/ml (Naik *et al.*, 2013). Pada sapi Holstein, konsentrasi puncak dicapai pada hari ke-14 dengan konsentrasi lebih dari 6 ng/ml (Henricks *et al.*, 1970). Konsentrasi progesteron sapi Aceh relatif sama dengan konsentrasi progesteron sapi Sahiwal pada fase midluteal yang dilaporkan sebesar $1,94 \pm 0,22$ ng/ml (Mondal dan Prakash, 2003). Mann dan Lamming (1992) mengatakan rendahnya konsentrasi progesteron berdampak terhadap rendahnya angka konsepsi. Willard *et al.* (2003) menambahkan bahwa salah satu penyebab utama kematian embrio adalah tidak cukupnya fungsi luteal yang diindikasikan oleh rendahnya konsentrasi progesteron.

Progesteron merupakan faktor utama penyebab terjadinya kematian embrio pada sapi. Pada sapi Aceh yang disinkronisasi dengan prostaglandin diketahui bahwa sapi yang mengalami kematian embrio dini memiliki konsentrasi progesteron yang lebih rendah dibandingkan dengan sapi fertil dengan konsentrasi progesteron pada hari ke-5 masing-masing adalah $1,93 \pm 0,30$ dan $2,4 \pm 0,42$ ng/ml (Siregar *et al.*, 2017). Keterbatasan penelitian

tersebut disebabkan penelitian dilakukan di bawah pengaruh cekaman panas lingkungan yang mungkin berperan juga sebagai penyebab terjadinya kematian embrio.

Sapi yang memiliki konsentrasi progesteronnya meningkat pada hari ke-7 pasca inseminasi mempunyai peluang yang baik untuk memelihara kebuntingan (Diskin dan Morris, 2006; McNeill *et al.*, 2006). Mekanisme terjadinya kematian embrio akibat rendahnya progesteron berhubungan dengan sekresi interferon tau (Mann *et al.*, 2006). Interferon tau adalah sinyal kebuntingan yang dihasilkan jaringan trophoblas yang berfungsi mencegah pelepasan prostaglandin F2 alfa (Robinson *et al.*, 1989). Rendahnya konsentrasi progesteron menghasilkan respons uterus yang rendah terhadap interferon tau sehingga lebih sensitif terhadap pelepasan prostaglandin F2 alfa (Shaham-Albalancy *et al.*, 2001).

MATERI DAN METODE

Dalam penelitian ini digunakan empat ekor sapi betina dewasa, umur 3-5 tahun, bobot badan 150-250 kg, sehat secara klinis dan memiliki reproduksi normal (sudah pernah beranak dan minimal telah mengalami dua kali siklus regular). Sapi yang akan diteliti merupakan sapi Aceh yang memiliki kriteria sesuai dengan Keputusan Menteri Pertanian Nomor 2907/Kpts/OT.140/6/2011.

Prosedur Penelitian

Sinkronisasi Berahi dan Inseminasi Buatan

Semua sapi betina disinkronisasi menggunakan hormon PGF₂ α (Lutalyze) yang diinjeksi secara intramuskulus dengan dosis 5 ml, dengan pola penyuntikan ganda dengan interval 11 hari. Deteksi berahi dilakukan sebanyak dua kali per hari yaitu pagi (08.00 WIB) dan sore (16.00 WIB) hari selama 30 menit. Sapi dianggap berahi dengan tanda-tanda berahi sekunder seperti menaiki sapi lain, vulva merah dan bengkak dan keluarnya mukus serviks. Inseminasi buatan dilakukan 12 jam setelah awal berahi.

Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah dilakukan mulai hari ke-5 sampai dengan 7 pasca inseminasi buatan. Sampel darah diambil melalui vena jugularis sebanyak 10 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung darah selanjutnya disimpan dalam termos. Kemudian darah didiamkan selama beberapa jam sampai keluar serumnya. Kemudian pemisahan serum dilakukan dengan cara sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Serum darah dipindahkan ke dalam microtube dan disimpan di dalam freezer -20 °C.

Pemeriksaan Kadar Progesteron

Serum yang telah dikoleksi diperiksa dengan menggunakan metode *enzymelinked-immunoassay* (ELISA). Disiapkan semua reagen, larutan standar, dan sampel. Kemudian dimasukkan 25µl larutan standar, control dan sampel ke dalam setiap *well microplate*, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruangan. Kemudian larutan tersebut dikeluarkan dari *well microplate* dan tidak dicuci. Dimasukkan 200 µl *enzyme conjugate* pada tiap *well microplate*, dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruangan. setelah itu homogenkan selama 10 detik. Kemudian lakukan pencucian terhadap spesimen tersebut dengan *wash solution* sebanyak 400 µl dengan campuran aquabides sebanyak 3 kali dengan menggunakan ELISA *washer*. Kemudian ditambahkan 200µl *substrate solution* ke dalam *well microplate*, kemudian diinkubasi selama 15-30 menit pada suhu ruangan, dan dihindarkan dari cahaya. Kemudian ditambahkan 100µl *stop solution* ke dalam *well microplate*, lalu lakukan pembacaan hasil dengan ELISA *reader* setelah 10 menit guna mengetahui kadar progesteron pada darah.

Pemeriksaan Kebuntingan dan Diagnosis Kematian Embrio

Pemeriksaan kebuntingan dilakukan dengan menggunakan metode transrektal ultrasonografi pada hari ke-25 setelah inseminasi buatan. Pemeriksaan diulang setiap 10 hari sampai hari ke-55 pasca inseminasi sesuai dengan petunjuk Caudhary dan Purohit (2012). Ultrasonografi transrektal dilakukan dengan *Mindray DP 10 Vet linear probe transrektal probe 50L60EAV* (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics CO.,LTD.). Sapi dianggap bunting pada hari ke-25 pasca inseminasi didasarkan adanya cairan *anechoic* dengan visualisasi embrio dan detak jantung pada salah satu kornua uterus sedangkan kematian embrio didiagnosis mulai hari ke-35 sampai 55 yang didasarkan visibilitas non-embrio, tidak terdapatnya tanda-tanda positif dari kebuntingan, atau adanya tanda-tanda embrio mengalami degenerasi.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil pengukuran konsentrasi progesteron dengan insiden kematian embrio dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian diperoleh hasil satu ekor sapi Aceh bunting yang bertahan sampai hari ke-55, satu ekor sapi Aceh yang mengalami kematian embrio (*late embryo mortality/LEM*) yang terjadi pada pemeriksaan hari 35 dan 2 ekor sapi Aceh yang tidak terdeteksi bunting. Hasil pemeriksaan kadar hormon progesteron pada sapi-sapi tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar hormon progesteron (ng/ml) pada sapi gagal bunting, sapi bunting dengan embrio yang bertahan hidup, dan sapi yang mengalami kematian embrio (LEM)

Sampel	Hari ke-			Rata-rata	Status
	5	6	7		
1	0,435	0,591	2,082	1,036±0,909	Bunting
2	8,209	2,678	0,571	3,819±3,945	LEM
3	1,155±0,626	2,494±2,780	3,051±1,157		Tidak bunting

Dari Tabel 1. terlihat bahwa seluruh sapi baik yang gagal bunting maupun sapi yang

bunting dengan embrio yang bertahan hidup menunjukkan konsentrasi yang relatif tinggi

pada hari ke-7 pasca IB yaitu di atas 2 ng/ml. Standar 2 ng/ml ini sudah ditetapkan oleh Amiruddin *et al.* (2001) sebagai standar konsentrasi progesteron sapi Aceh bunting pada hari ke-21 pasca IB. Diduga bahwa sapi yang gagal bunting, konsentrasi progesteronnya akan cenderung menurun dan akan berada di level kurang dari 2 ng/ml pada hari ke-21 yang disebabkan oleh lisisnya corpus luteum akibat kerja dari PGF2 α yang disekresikan oleh endometrium. Pada sapi LEM, konsentrasi progesteron pada hari ke-7 pasca IB berada di bawah 2 ng/ml.

Konsentrasi progesteron secara keseluruhan hari pada sapi LEM lebih tinggi dibandingkan dengan sapi bunting dengan embrio yang bertahan hidup yaitu masing-masing 3,819 \pm 3,945 dan 1,036 \pm 0,909 ng/ml. Terdapat perbedaan pada pola sekresi hormon progesteron pada hari ke-5 sampai dengan hari ke-7. Pada sapi bunting dengan embrio yang bertahan hidup cenderung mengalami peningkatan konsentrasi progesteron mulai hari ke-5 sampai dengan ke-7 dengan puncak sekresi pada hari ke-7 yaitu sebesar 2,082 ng/ml, sedangkan konsentrasi progesteron pada hari ke-5 dan ke-6 masing-masing adalah 0,435 dan 0,591 ng/ml. Sapi LEM cenderung mengalami penurunan konsentrasi progesteron mulai hari ke-5 sampai dengan ke-7 dengan puncak sekresi pada hari ke-5 yaitu sebesar 8,209 ng/ml, kemudian mengalami penurunan yang signifikan pada hari ke-6 menjadi 2,678 ng/ml dan akhirnya menjadi 0,571 ng/ml pada hari ke-7. Peningkatan sekresi progesteron pada sapi dengan embrio bertahan hidup sesuai dengan pernyataan Ginther *et al.* (2010) yang disitasi oleh Suprihatin *et al.* (2016) bahwa konsentrasi progesteron akan terus meningkat sampai menjelang akhir kebuntingan. Kadar progesteron yang meningkat pasca IB memberikan pengaruh yang baik terhadap perkembangan embrio dan memperkuat sistem pengenalan kebuntingan pada induk (*maternal recognition of pregnancy*) sehingga kebuntingan dapat dipertahankan (Mann dan Lamming, 2001). Mc Neill *et al.* (2006) menambahkan bahwa sapi yang konsentrasi progesteronnya meningkat pada hari ke-7

pasca inseminasi memiliki peluang yang bagus dalam memelihara kebuntingan.

Pada penelitian ini sekresi progesteron hari ke-5 pada sapi bunting dengan embrio bertahan hidup lebih rendah yaitu 0,435 ng/ml dibandingkan laporan Siregar *et al.* (2017) yang melaporkan konsentrasi progesteron pada hari yang sama adalah 4,20 ng/ml sedangkan pada sapi LEM adalah 1,93 ng/ml. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan oleh jumlah sampel yang terlalu sedikit yang digunakan oleh peneliti sehingga variasi data tidak ditemukan.

Pada sapi LEM terjadi penurunan sekresi progesteron dari hari ke-5 (8,209 ng/ml), hari ke-6 (2,678 ng/ml) sampai hari ke-7 (0,571 ng/ml). Menurut Willard *et al.* (2003), rendahnya konsentrasi progesteron pada sapi LEM disebabkan oleh fungsi luteal yang tidak memadai. Progesteron berfungsi memproduksi dan mensekresikan protein endometrium yang penting untuk kehidupan embrio (McNeill *et al.*, 2006). Konsentrasi progesteron berhubungan dengan jumlah corpus luteum (Siregar, 2002).

Pada sapi yang tidak bunting puncak sekresi progesteron tertinggi terdapat di hari ke-7 (3,051 \pm 1,157 ng/ml) hari ke-6 (2,494 \pm 2,780 ng/ml) dan hari ke-5 (1,155 \pm 0,626 ng/ml). Menurut McNeill *et al.* (2006) penurunan sekresi progesteron pada hari ke-7 menyebabkan gangguan sekresi protein endometrium sehingga lingkungan hidup embrio terganggu dan menghambat perkembangan embrio yang dapat berkontribusi pada kematian embrio dini. Hal ini sesuai dengan pernyataan Santos *et al.* (2014) dan Suprihatin *et al.* (2016) bahwa kematian embrio dini dapat terjadi pada 0-7 hari pasca inseminasi (*very early embryo mortality/VEEM*) dan dapat pula terjadi pada 7-24 hari pasca inseminasi (*early embryo mortality/EEM*). Umumnya pada sapi 40% kehilangan konsepsi terjadi pada 8-16 hari kebuntingan (Eileen *et al.*, 2009).

KESIMPULAN

Sekresi progesteron sapi LEM pada hari ke-5 sampai dengan ke-7 cenderung menurun

sedangkan pada sapi yang bertahan hidup cenderung meningkat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Hasil penelitian ini merupakan bagian dari kegiatan Hibah Profesor tahun anggaran 2019. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Syiah Kuala atas kepercayaan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat dilakukan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Amiruddin., Siregar, T.N., Riady, G., Budiman, H., 2001. Efektivitas beberapa metode diagnosis kebuntingan pada sapi. *J. Med. Vet.* 1(2): 45-48.
- Chaudary, A.K., Purohit, G.N., 2012. Ultrasonographic detection of early pregnancy loss in dairy cows. *J. Anim. Sci Adv.* 2: 706-710.
- Diskin, M.G., Morris, D.G., 2006. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim.* 9: 260-267.
- Efendi, M., Siregar, T.N., Hamdan, Dasrul, Thasmi, C.N., Razali, Sayuti, A., Panjaitan. B., 2015. Angka kebuntingan sapi lokal setelah diinduksi dengan protokol Ovsynch. *J. Medika Vet.* 9(2): 159-162.
- Eileen, B.M., Roche, J.F., Patrick, L., Niam, F., Mark, C., 2009. Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology.* 72(7): 986-992.
- Hafez, E.S.E., 2000. Anatomy of male reproduction. In *Reproduction in Farm Animals.* Lippincott William and Wilkins. A Wolter Kluwer.
- Henricks, D.M., Dickey, J.F., Niswender, G.D., 1970. Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrus cycle and early pregnancy in cows. *Biol Reprod.* 2: 346-351.
- Humblot, P., 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology.* 56: 1417-1433.
- Lestari, T.D., 2006. Metode deteksi kebuntingan pada ternak sapi. Skripsi, Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction.* 121: 175-180.
- Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E., 2006. Effect of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. *Vet. J.* 171: 500-503.
- Mann, G.M., Lamming, G.E., 1992. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dornest Anim.* 34: 269-274.
- McNeill, R.E., Diskin, M.G., Sreenan, J.M dan Morris, D.G., 2006. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology.* 65: 1435-1441.
- Mondal, S., Parkash, B.S., 2003. Peripheral plasma progesterone concentration in relation to estrus expression in Sahiwal cows. *Indian Journal Physiol. Pharmacol.* 47: 27-34.
- Nadjamudin., Rusdin., Sriyanto., Amrozi, Agungpriyono, S., Yusuf, T.L., 2010. Penentuan siklus estrus pada kancil (*Tragulus javanicus*) berdasarkan perubahan sitologi vagina. *Jurnal Veteriner.* 11:81-86.
- Naik, B.R., Kumar, A.V.N.S., Bramhiah, K.V., Ravi, A., Chakravathi, V.O., 2013.

- Estrogen and progesterone hormone levels in Panganur cattle. *J. Agricult Vet Sci.* 5: 50-53.
- Robinson, N.A., Leslie, K.E., Walton, J.S., 1989. Effect of treatment with Progesterone on pregnancy rate and plasma concentrations of progesterone in holstein cows. *J. Dairy Sci.* 72(1): 202-7.
- Setiawan, A., Dinasih, E., Zamanti, D., 2017. Penggunaan preparat progesteron dan hormon GnRH dalam penentuan estrus pada program superovulasi sapi limosin. *Jurnal Pertanian.* 8(1): 8-16.
- Shaham-Albalancy, A.Y., Folman, M., Kaim, M., Rosenberg, C., dWolfenson, D., 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations an bovine uterine PGF2 alfa secretion in subsequent oestrous cycle. *Reproduction.* 122: 643-648.
- Siregar, T.N., 2002. Pengukuran profil progesteron sebagai suatu metode diagnosis kebuntingan dini dan kelahiran kembar pada domba lokal. *Media Kedokteran Hewan.* 18(2): 73-77.
- Siregar, T.N., Melia, J., Rohaya, R., Thasmi, C.N., Masyitha, D., Wahyuni, S., Rossa, J., Nurhafni, N., Panjaitan, B., Herrialfian, H., 2016. Determining proportion of exfoliative vaginal cell during various stages of estrus cycle using vaginal cytology techniques in Aceh cattle, *Vet Med Int.*
- Siregar, T.N., Wajdi, F., Akmal, M., Fahrimal, Y., Adam, M., Panjaitan, B., Sutriana, A., Daud, R., Armansyah, T., Meutia, N., 2017. Embryonic death incident due to heat stress and effect of therapy with gonadotropin releasing hormone (GnRH) in Aceh cattle. *Vet. Med. Zoot.* 75(97): 70-74.
- Suprihatin, N., Tumbelaka, L.I.T.A., Setiadi, M.A., 2016. Profil progesteron air susu dan tingkat kebuntingan sapi perah pasca sinkronisasi estrus menggunakan prostaglandin F2 alfa atau progesterone-CIDR. *Jurnal Veteriner.* 17(3): 396-403.
- Vernunft, A., Weitzel, J.M., viergutz, T., 2013. Corpus luteum development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows. *Veterinari Medicina.* 58(4): 221-229.
- Wawo, A.A., 2014. Pengaruh pejantan terhadap tingkat kebuntingan dan berat lahir pada sapi yang di pelihara secara semi-intensif. Skripsi, Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin.
- Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A., Whisnant, C., 2003. The effect of GnRH administration post insemination on serum concentration of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology.* 59: 1799-1810.