

## Deteksi Tingkat Kesuburan Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) Betina Melalui Metabolit Steroid Feses

### *Detection of Fertility Levels of Female Bawean Deer (*Axis kuhlii*) Based on Fecal Steroid Metabolic*

Mitha Ardila Rahmawati<sup>1\*</sup>, Mas'ud Hariadi<sup>2</sup>, Tjuk Imam Restiadi<sup>2</sup>, Pudji Srianto<sup>2</sup>, Rimayanti<sup>2</sup>, Tita Damayanti Lestari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Magister of Biology Reproduction, <sup>2</sup>Department of Veterinary Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga,

UNAIR C-Campus Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia, 60115,

\*Corresponding author: [mitha.ardila94@gmail.com](mailto:mitha.ardila94@gmail.com)

#### Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi tingkat kesuburan rusa Bawean (*Axis kuhlii*) betina melalui metabolit steroid feses menggunakan uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Penelitian ini menggunakan lima ekor rusa Bawean betina di Taman Flora Kota Surabaya, masing-masing rusa ditandai menggunakan kalung R1, R2, R3, R4, dan R5. Feses dari masing-masing rusa dilakukan pengambilan pada hari ke-1, ke-6, ke-11, ke-16, dan ke-21. Sampel feses dikumpulkan pada pagi hari dan disimpan pada suhu -20°C. Sampel yang terkumpul selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan metode *freeze dry*. Sampel diuji menggunakan ELISA. Hasil dari pengukuran kadar metabolit steroid feses pada lima ekor rusa Bawean betina menunjukkan tiga ekor rusa Bawean (R1, R4, dan R5) dalam fase luteal atau bunting yang ditunjukkan dengan peningkatan hormon progesteron dari pengambilan hari ke-1 hingga hari ke-21. Dua ekor rusa Bawean lainnya (R2 dan R3) dalam fase folikuler atau birahi yang ditunjukkan dengan penurunan kadar hormon progesteron pada pengambilan hari ke-11 untuk rusa R2 dan pengambilan hari ke-16 untuk rusa R3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar metabolit steroid dalam feses dapat digunakan untuk mengetahui fase folikuler dan luteal serta status kebuntingan dari rusa Bawean betina.

Kata kunci: Rusa Bawean, metabolit steroid feses, tingkat kesuburan, ELISA

#### Abstract

The aim of the study was to detect the fertility level of females bawean deer (*Axis kuhlii*) through fecal steroid metabolic which were tested using *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). The study used five females Bawean deer in Taman Flora Surabaya, which were marked using R1, R2, R3, R4, and R5 necklaces. The feces of each deer was collected on the 1<sup>st</sup> day, 6<sup>th</sup> day, 11<sup>th</sup> day, 16<sup>th</sup> day, and 21<sup>st</sup> day. The samples which were collected then extracted using the freeze dry method. Samples were tested using ELISA. The results of the measurement of the levels of fecal steroid metabolic in five Bawean deers showed that three bawean deer (R1, R4, and R5) were in the luteal or pregnant phase as indicated by the increased of progesterone from 1<sup>st</sup> day to 21<sup>st</sup> day. While the other two Bawean deer (R2 and R3) were in the follicular or estrous phase as indicated by the decreased of level of faecal steroid metabolic on 11<sup>th</sup> day for deer R2 and 16<sup>th</sup> day for deer R3. The results showed that the levels of the fecal steroid metabolic can be used to determine the follicular phase and luteal phase and the pregnancy status of female bawean deer.

Keywords: Bawean deer, fecal steroid metabolic, fertility level, ELISA

Received: 14 Agustus 2020

Revised: 30 Agustus 2020

Accepted: 12 Oktober 2020

#### PENDAHULUAN

Rusa Bawean (*Axis kuhlii*) adalah rusa endemik yang berada di Pulau Bawean dengan status dilindungi sejak tahun 1970 (Semiadi et

al., 2003). Jumlah populasi rusa bawean sangat rendah, sehingga IUCN (*International Union for Conservation of Nature and Natural Resource*) mengkatagorikan rusa Bawean dalam *Critical Endangered* (terancam) (Wirdateti et al., 2013).



Penelitian mengenai rusa Bawean sangat diperlukan untuk dapat mendukung efektivitas konservasi rusa Bawean. Salah satunya penelitian mengenai reproduksi rusa Bawean yang masih terbatas (Ismail, 2011).

Reproduksi makhluk hidup tidak lepas dari mekanisme kerja hormon. Hormon reproduksi merupakan golongan hormon steroid yaitu testosteron, estrogen, dan progesteron (Bautista *et al.*, 2013). Pengukuran kadar hormon steroid dapat dilakukan menggunakan metode invasif (darah) dan non-invasif (feses, urin, dan susu). Metode non-invasif dengan sampel feses lebih banyak digunakan untuk memantau hormon reproduksi pada hewan liar yang hidup bebas (Kumar *et al.*, 2013). Hormon steroid dalam sampel darah dan feses sangat berkorelasi. Pengujian hormon steroid dalam feses merupakan metode yang ideal untuk memperoleh informasi tentang keadaan fisiologis hewan liar, siklus reproduksi, dan kebuntingan (Deng *et al.*, 2014).

Fungsi utama progesteron adalah meningkatkan proliferasi mukosa uterus sehingga dapat menerima ovum yang dibuahi dan mempertahankan uterus selama proses kebuntingan (Voet *et al.*, 2013). Kadar progesteron akan dipertahankan selama kebuntingan apabila terjadi fertilisasi, sebaliknya kadar progesteron menurun secara drastis hingga berakhirnya siklus birahi apabila tidak terjadi fertilisasi (Nadjamudin dkk, 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi tingkat kesuburan rusa Bawean betina melalui metabolit steroid feses menggunakan uji *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Penelitian mengenai rusa Bawean sangat diperlukan untuk dapat mendukung efektivitas konservasi rusa bawean mengingat rendahnya angka populasi rusa bawean saat ini.

## METODE PENELITIAN

### Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan sampel feses rusa Bawean dilakukan di kandang rusa Bawean Taman Flora Kota Surabaya, Jawa Timur. Pembuatan ekstraksi feses dilakukan di Laboratorium

Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Uji ELISA dilakukan di *Institute Tropical Disease* Universitas Airlangga. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan Februari – Mei 2019.

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi pot salep, *hand rubber glove*, *cooler*, timbangan, mortar, *centrifuge tube* 15 ml, *water bath*, *vortex*, dan *centifuge*. Alat uji ELISA meliputi: *microplate*, mikropipet, *vortex*, *magnetic strirer*, *low temp incubator* IL701 (Yamato), *immunowash* Model 1575 (Biorad), dan *ELISA microplate reader* (Biorad). Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah feses rusa Bawean betina, methanol 90% dan kit ELISA Progesteron E0011Go (Bioassay Technology Laboratory, China).

### Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah feses dari 5 ekor rusa Bawean betina yang ditandai kalung R1, R2, R3, R4, dan R5. Feses diambil pada hari ke-1, ke-6, ke-11, ke-16, dan ke-21. Pengambilan sampel feses dilakukan pagi hari pukul 06.00 - 09.00 WIB. Feses yang diambil adalah feses segar yang baru keluar dari anus. Sampel feses selanjutnya dimasukkan ke dalam pot salep dan diberi label. Sampel yang dikoleksi disimpan pada suhu -20°C hingga proses ekstraksi dilakukan.

### Pembuatan Ekstraksi Feses

Proses ekstraksi sampel feses menurut Wang *et al.* (2016) bahwa sampel feses diaklimatisasi pada suhu kamar dan dihomogenisasi menggunakan mortar. 0,3 gram serbuk sampel ditambahkan methanol 90% sebanyak 5 ml. Sampel diekstraksi menggunakan *water bath* pada suhu 60° C selama 20 menit. Semua tabung disentrifugasi pada 1.090 xg selama 20 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung. Pellet yang tersisa ditambahkan 5 ml methanol 90% dan dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 1 menit. Sampel disentrifuge 1.090 xg selama 15 menit dan supernatan dipisahkan. Kedua

supernatan dikeringkan menggunakan metode *freeze dry*. Sampel yang telah kering dilarutkan kembali dengan 1 ml methanol. Sampel disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  hingga dilakukan uji ELISA. Kit ELISA yang digunakan dalam penelitian ini adalah kit ELISA Progesteron E0011Go (Bioassay Technology Laboratory, China). Data yang didapatkan pada penelitian ini diolah dan dipaparkan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Penentuan Fase Folikuler dan Fase Luteal Rusa Bawean Betina

Menurut Siregar (2009) bahwa konsentrasi progesteron serum darah pada saat fase luteal sekitar 2-10 ng/ml dan pada fase folikuler mencapai basal ( $<1$  ng/ml). Dari Tabel 1 terlihat bahwa pada pengambilan hari ke-1 didapatkan 2 dari 5 ekor rusa dalam fase folikuler dan 3 dari 5 ekor rusa dalam fase luteal. Pengambilan hari ke-6 didapatkan 1 dari 5 ekor rusa dalam fase folikuler dan 4 dari 5 ekor rusa dalam fase luteal. Pengambilan hari ke-11 didapatkan 1 dari 5 ekor rusa dalam fase folikuler dan 4 dari 5 ekor rusa dalam fase luteal. Pengambilan hari ke-16 didapatkan 1 dari 5 ekor rusa dalam fase folikuler dan 4 dari 5 ekor rusa dalam fase luteal. Pengambilan hari ke-21 didapatkan 5 ekor rusa dalam fase luteal (Gambar 1).

### Penentuan Rusa Bawean Bunting dan Tidak Bunting

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada rusa R1, R4, dan R5 terdapat peningkatan hormon progesteron selama pengambilan sampel dari hari ke-1 hingga hari ke-21, hal ini menunjukkan bahwa rusa R1, R4, dan R5 dalam kondisi bunting atau fase luteal (Gambar 2).

Pada rusa R2 dan R3 terdapat peningkatan hormon progesteron pada hari ke-1 dan hari ke-6 (rusa R2) dan pada hari ke-1 hingga hari ke-11 (rusa R3). Terjadi penurunan kadar hormon progesteron pada hari ke-11 (rusa R2) dan pada hari ke-16 (rusa R3), hal tersebut menunjukkan pada rusa R2 dan R3 bersiklus estrus normal dan tidak terjadi kebuntingan (Gambar 3).

Satu siklus estrus terdiri dari fase folikuler dan luteal. Fase folikuler terjadi pertumbuhan dan pematangan folikel yang ditandai dengan rendahnya kadar progesteron. Fase folikuler menimbulkan gejala proestrus dan estrus. Fase luteal terjadi pembentukan dan berfungsinya *korpus luteum* sehingga menghasilkan kadar hormon progesteron yang tinggi. Fase ini menimbulkan gejala metestrus dan diestrus (Hafez and Hafez, 2000).

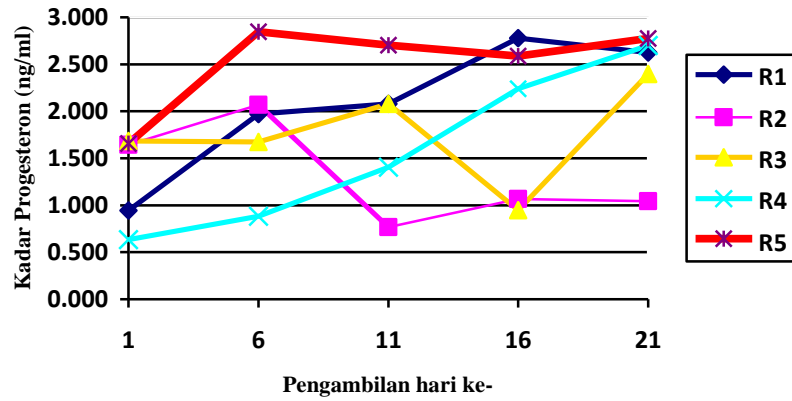
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kadar hormon progesteron yang didapatkan pada 5 ekor rusa Bawean betina dalam fase yang berbeda-beda. Rusa R1, kadar hormon progesteron menunjukkan peningkatan dari hari ke-1 hingga hari ke-21 yang menunjukkan bahwa rusa R1 dalam fase luteal atau bunting. Kondisi tersebut juga dibuktikan dengan rusa R1 mengalami partus pada 10 hari setelah pengambilan feses hari ke-21. Konsentrasi hormon progesteron mengalami peningkatan pada saat bunting karena progesteron juga disekresikan oleh plasenta. Progesteron berperan untuk mempertahankan kebuntingan (Krepschi et al., 2013).

Kadar hormon progesteron pada rusa R2 menunjukkan peningkatan dari hari ke-1 hingga hari ke-6. Sedangkan pada hari ke-11 kadar hormon progesteron menurun pada level basal dan meningkat pada hari ke-16 dan hari ke-21. Hari ke-11 menunjukkan bahwa rusa R2 dalam fase folikuler atau birahi. Fase folikuler, *korpus luteum* dari siklus birahi sebelumnya telah mengalami regresi, sehingga kadar progesteron rendah. Hormon progesteron yang ada pada fase folikuler merupakan hasil sisa-sisa *korpus luteum* dari siklus birahi sebelumnya (Hafez and Hafez, 2000).

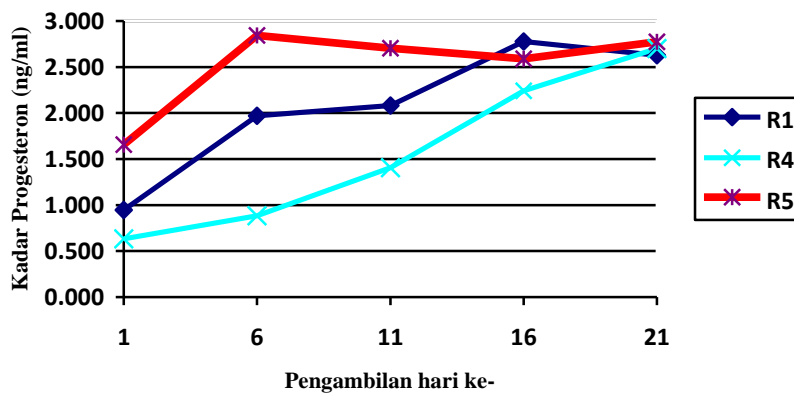
Kadar hormon progesteron pada rusa R3 menunjukkan peningkatan dari hari ke-1 hingga hari ke-11. Sedangkan pada hari ke-16 kadar hormon progesteron menurun pada level basal dan meningkat pada hari ke-21. Pada hari ke-16 menunjukkan bahwa rusa R3 dalam fase folikuler atau birahi, hal ini sesuai dengan pernyataan Nalley dkk (2011) bahwa pada fase proestrus dan estrus, kadar hormon progesteron

**Tabel 1.** Kadar progesteron Rusa Bawean pada pengambilan hari ke-1, ke-6, ke-11, ke-16, dan ke-21

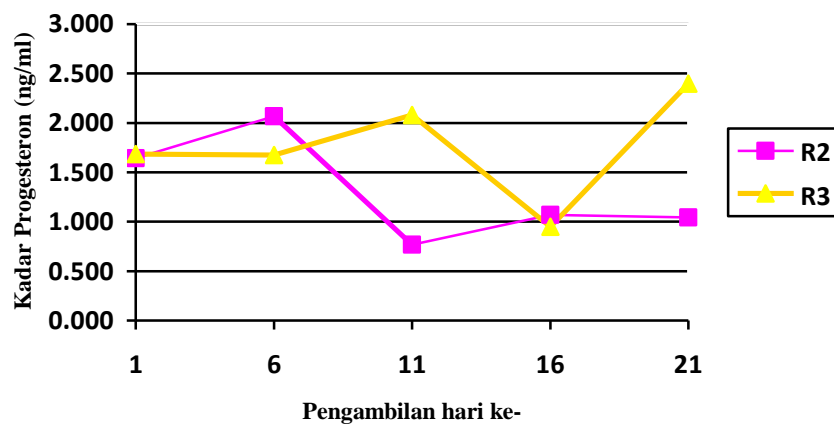
Rusa	Kadar Progesteron Pengambilan Hari ke- (ng/ml)				
	1	6	11	16	21
R1	0.946	1.969	2.080	2.778	2.626
R2	1.644	2.068	0.768	1.068	1.043
R3	1.685	1.674	2.080	0.949	2.396
R4	0.634	0.883	1.406	2.240	2.700
R5	1.658	2.845	2.703	2.588	2.775



**Gambar 1.** Tren kadar hormon progesteron dalam feses rusa R1, R2, R3, R4, dan R5.



**Gambar 2.** Tren kadar hormon progesteron dalam feses rusa R1, R4, dan R5.



**Gambar 3.** Tren kadar hormon progesteron dalam feses rusa R2 dan R3.

rendah karena *korpus luteum* belum berkembang.

Kadar hormon progesteron pada rusa R4 menunjukkan peningkatan dari hari ke-1 hingga hari ke-21. Pada hari ke-1 terlihat bahwa kadar hormon progesteron pada level basal atau rendah yang menunjukkan rusa Bawean R4 dalam fase folikuler atau birahi. Kadar hormon progesteron meningkat pada hari-hari berikutnya dapat menunjukkan bahwa rusa R4 telah terjadi ovulasi dan dalam fase luteal atau bunting, hal ini sesuai dengan pernyataan Mulyati *et al.*, (2006) bahwa kadar progesteron yang tinggi setelah fase folikuler menandakan telah terjadi ovulasi.

Korpus luteum terbentuk setelah terjadi ovulasi pada folikel yang telah matang sehingga kadar progesteron pada fase luteal lebih tinggi daripada fase folikuler. Kondisi tersebut dibuktikan dengan rusa R4 mengalami partus kurang lebih 7 bulan setelah pengukuran hormon progesteron pada hari ke-21. Mengingat masa kebuntingan rusa bawean sekitar 225-230 hari (7,5 bulan) (Nurchayho *et al.*, 2015).

Menurut penelitian Jain *et al.*, (1980) bahwa konsentrasi progesteron selama kebuntingan pada kambing hari ke 90 sekitar 1.91 ng/ml dan meningkat secara signifikan pada hari ke 120 menjadi 2.50 ng/ml yang selanjutnya menurun selama periode *post partus* yang menunjukkan bahwa pada rusa R4, kadar hormon progesteron dalam feses selama kebuntingan dapat diasumsikan meningkat secara signifikan dan menurun pada saat *partus*.

Kadar hormon progesteron pada rusa R5 menunjukkan peningkatan dari hari ke-1 hingga hari ke-21. Hal tersebut menunjukkan bahwa rusa R5 dalam fase luteal atau bunting. Kondisi tersebut juga dibuktikan dengan rusa R5 mengalami partus pada 14 hari setelah pengambilan feses hari ke-21. Pertumbuhan dan perkembangan uterus dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi hormon progesteron. Hormon progesteron berperan dalam proses implantasi sel ovum, apabila terjadi kebuntingan maka progesterone akan terus menerus disekresi untuk menjaga kebuntingan. Hormon progesteron bersifat sinergis dengan prolaktin

yang berfungsi selama mammogenesis dengan berperan merangsang pertumbuhan dan perkembangan kelenjar susu untuk mempersiapkan produksi susu bagi anak yang akan dilahirkan (Voet *et al.*, 2013).

Kadar hormon progesteron dalam feses pada pengambilan hari ke-21 pada rusa awal kebuntingan (R4) dan rusa akhir kebuntingan (R1 dan R5) menunjukkan kadar yang hampir sama (>2ng/ml) dikarenakan hormon progesteron mulai meningkat pada akhir estrus hingga kebuntingan terjadi dengan terbentuknya *korpus luteum* dan dipertahankan selama kebuntingan yang selanjutnya menurun pada saat mendekati partus dan selama periode *post partus*.

Hormon steroid yang diekskresikan melalui feses dapat digunakan sebagai material yang dianalisis untuk memantau status reproduksi, karena dalam feses mengandung hormon (dalam bentuk metabolit) yang merupakan substansi dari hormon yang disekresikan oleh kelenjar endokrin, sehingga profil hormon dalam feses tetap sesuai dengan profil hormon aslinya dalam darah (Pudjirahayu *et al.*, 2015).

## KESIMPULAN

Kadar hormon progesteron dalam feses rusa Bawean betina dapat ditentukan dengan uji ELISA sehingga dapat menentukan fase folikuler, fase luteal dan status kebuntingan rusa bawean betina. Pengukuran hormon progesteron melalui feses dapat menjadi alternatif untuk mengetahui tingkat kesuburan dan siklus reproduksi pada hewan liar lainnya.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan *Institute of Tropical Disease*, Universitas Airlangga atas dukungan fasilitas sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Peneliti juga mengucapkan terimakasih kepada pihak Taman Flora Kota Surabaya sehingga penelitian dapat dilaksanakan dengan baik.



## DAFTAR PUSTAKA

- Bautista, L. M., Silvan, G., Caceres, S., Fernandez, L. M., Bravo, C., Illera, J. C., Alonso, J. C., & Blanco, G. (2013). Faecal Sexual Steroid in Sex Typing and Endocrine Sex of Great Bustards. *European Journal Wildlife Research*, 59(6), 815-822.
- Deng, H., Liu, S., Jin, X., Ge, X., He, L., Liu, G., & Hu, D. (2014). Research on Methods of Preserving Fecal Steroid Hormones in Giant Panda (*Ailuropoda melnoleuca*). *North-Western Journal of Zoology*, 10(1), 210-216.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. In: Hafez, E. S. E. (Ed). *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, pp: 68-81.
- Ismail, D. (2011). Tingkah Laku Makan Rusa Jawa (*Cervus timorensis*) yang Dipelihara Pada Lokasi Penangkaran yang Berbeda. *Jurnal Bumi Lestari*, 11, 147-158.
- Jain, G. C., Batra, S. K., Pahwa, G. S., & Pandey, R. S. (1980). Plasma Progesterone Levels During Late Pregnancy in Goats. *Zbl. Veterinary Medicine*, 27, 513-516.
- Krepschi, V. G., Polegato, B. F., Zanetti, E. S., & Duarte, J. M. B. (2013). Fecal Progestins During Pregnancy and Postpartum Periods of Captive Red Brocker Deer (*Mazama Americana*). *Animal Reproduction Science*, 137, 62-68.
- Kumar, A., Mehrotra, S., Dangi, S. S., Singh, G., Chand, S., Singh, L., Mahla, A. S., Kumar, S., & Nehra, K. (2013). Faecal Steroid Metabolites Assay as a Non-Invasive Monitoring of eproductive Status in Animals. *Veterinary World*, 59-63.
- Mulyati, S., Mustofa, I., & Mahaputra, L. (2006). Estrous Cycle and Serum Progesterone Level of Mice (*Mus musculus*) Before and after Immunization Using Antifertility Substance Goat Zona Pellucida-3 (gZP3). *Veterinary Medicine Journal*, 22(1), 51-56.
- Nadjamudin, Rusdin, Sriyato, Amrozi, Agungpriyono, S., & Yusuf, T. L. (2010). Penentuan Siklus Estrus pada Kancil (*Tragulus javanicus*) Berdasarkan Perubahan Sitologi Vagina. *Jurnal Veteriner*, 11, 81-86.
- Nalley, W. M. M., Handarin, R., Rizal, M., Arifiantini, R. I., Yusuf, T. L., & Purwantara, B. (2011). Penentuan Siklus Estrus Berdasarkan Gambaran Sitologi Vagina dan Profil Hormon pada Rusa Timor. *Jurnal Veteriner*, 12(2), 98-106.
- Nurchahyo, W., Anggraeni, D., & Imron, M. A. (2015). Monitoring of Physiological and Parsites Status of Bawean Deer (*Axis kuhlii*) in Its Habitat as a Baseline for Wildlife Conservation Endeavor. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(2), 126-133.
- Pudjirahayu, A., Supriatna, I., Agungpriyono, S., & Agil, M. (2015). Deteksi Umur Pubertas Muncak (*Muntiacus muntjak muntjak*) Betina berdasarkan Analisis Metabolit Estrogen dan Progesteron Feses. *Jurnal Veteriner*, 16(1), 78-87.
- Semiadi, G., Subekti, K., Utama, I. K., Masy'ud, B., & Affandy, L. (2003). Antler's Growth of the Endangered and Endemic Bawean Deer (*Axis kuhlii Muller & Schlegel*, 1842). *Treubia*, 33, 89-95.
- Siregar, T. N. (2009). Profil Hormon Estrogen dan Progesteron Pada Siklus Birahi Kambing Lokal. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 3(2), 240-247.

- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamental of Biochemistry Life at Molecular Level*. Fourth Edition. United States of America, pp: 855-856.
- Wang, Y. H., Liu, S. Q., Yang, S., Zhang, T. X., Wei, Y. T., Zhou, J. T., Hu, D. F., & Li, L. H. (2016). Determination of Ovarian Cyclicity and Pregnancy Using Fecal Progesterone in Forest Musk Deer (*Moschus berezovskii*). *Animal Reproduction Science*, 170, 1-9.
- Wirdateti, R. T. P., Nugraha, G., Semiadi, S., Widyastuti, K., & Yulianto. (2013). Kualitas Kriopreservasi Semen Rusa Bawean (*Axis kuhlii*; Temminck, 1836) Hasil Penangkaran. *Berita Biologi*, 12(3), 367-374.

\*\*\*