

Penentuan Siklus Estrus pada Kancil (*Tragulus javanicus*) Berdasarkan Perubahan Sitologi Vagina

(DETERMINATION OF ESTROUS CYCCL E ON MOUSE DEER (*Tragulus javanicus*) BASED ON VAGINAL SITOLOGYS CHANGED)

Najamudin¹, Rusdin¹, Sriyanto²,
Amrozi³, Srihadi Agungpriyono⁴, Tuty Laswardi Yusuf³

¹Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian. Universitas Tadulako,
Jl Soekarno Hatta, Palu, Sulawesi Tengah
Telpon: 0451-429738; 422611, Email: naja_mudin@yahoo.co.id

²Fakulti Perubatan Veterinar, Universiti Putra Malaysia,

³Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

⁴Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi,
Fakultas Kedokteran Hewan , Institut Pertanian Bogor, Bogor

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the estrus cycle and the length of estrus in *Tragulus javanicus* on the basis of its vaginal cytology. Vaginal swabs were collected daily at 7 am for two months. Smears of the swab were then prepared on glass slide and they were stained with Giemsa. Vaginal epithelial cells; parabasal, intermediet and superficial cells were counted and their percentages during proestrus, estrus and diestrus were determined. Diestrus was characterized by the absent of superficial cells in the vaginal epithel. Proestrus was characterized by the progressive increase in percentage of intermediet/superficial cells in vaginal epithel, whereas estrus was characterized by the presence of superficial/cornification cells in most vaginal epithel. On the basis of its vaginal cytology, it was determined that the estrous period of female *Tragulus javanicus* was 3 days (48-60 h) and the length was 11 days (10-14 day). The change in the cytology of vaginal epithelial cells appeared to a good marker to determine the estrus cycle phase of the *Tragulus javanicus*.

Key words: Cytology, epithel, vagina, cycle estrous, parabasal, intermediet, superficisl snd cornification

PENDAHULUAN

Kancil (*Tragulus javanicus*) merupakan salah satu satwa langka di Indonesia yang memerlukan perhatian khusus dalam upaya pelestariannya. Populasi kancil saat ini mengalami penurunan akibat aktivitas manusia dan pembukaan hutan serta ancaman predator yang bisa memangsanya.

Pembiakan kancil secara alami di penangkaran belum membuahkan hasil seperti yang diharapkan. Faktor penyebab kurang berhasilnya pembiakan kancil di penangkaran belum diketahui secara pasti, namun kemungkinan besar disebabkan oleh keterbatasan pengetahuan atau kurang informasi tentang pola biologi reproduksi satwa ini (Ralls *et al.*, 1975; Haron *et al.*, 2000; Agungpriyono *et al.*, 2002).

Pengetahuan tentang siklus estrus pada kancil betina, terutama lama periode estrus dan waktu ovulasi merupakan informasi yang sangat penting dalam menentukan tingkat keber-

hasilan perkawinan. Pada hewan betina, penentuan siklus estrus dapat dilakukan melalui pengamatan tingkah laku, namun tidak cukup dapat dipercaya dalam penentuan status reproduksi. Adanya perbedaan pemunculan perubahan perilaku seksual pada setiap spesies yang berbeda mengakibatkan pengamatan perubahan perilaku seksual saja tidak cukup untuk menentukan waktu tepat untuk kawin. Metode lain dalam pengamatan biologi reproduksi di antaranya dengan mempelajari gambaran perubahan sel epitel (sitologik) vagina (Williams *et al.*, 1992; Möhle *et al.*, 2002). Penelitian dengan metode ini telah berhasil dilakukan pada beberapa spesies hewan, seperti: pada monyet *Squirrel (Saimiri scureus)* (Rosenblum *et al.*, 1967; Hutchinson, 1970), beruang matahari (*Helarctos malayanus*) (Onuma *et al.*, 2002), panda rakasasa (*Ailuropoda melanoleuca*) (Attia, 1998). Namun, sampai saat ini, penelitian serupa pada kancil

(*T. javanicus*) belum pernah dilaporkan.

Pengaturan estrus dipengaruhi oleh hormon gonadotropin yang kemudian mempengaruhi produksi hormon estrogen dan progesteron berdasarkan aktifitas ovarium. Estradiol yang diproduksi dari aktifitas gelombang folikel ovarium selama fase luteal siklus estrus. Efek estrogen pada poros hipotalamus-hipofisa dalam ketidakhadiran progesteron meningkatkan sekresi LH ke dalam peredaran darah menyebabkan ovulasi (Gordon, 1994). Hormon progesteron mulai meningkat setelah ovulasi dengan terbentuknya *corpus luteum* (CL), dimana hal tersebut menandakan bahwa hewan berada dalam fase luteal.

Fluktuasi hormon akan berpengaruh terhadap gambaran sel epitel vagina. Pada fase luteal (pengaruh hormon progesteron), hewan tidak estrus terdapat sel parabasal, sedangkan memasuki fase estrus (pengaruh hormon estrogen) sel epitel berubah menjadi sel superfisial dan kornifikasi yang menandakan hewan dalam keadaan puncak estrus (Boume, 1990). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui siklus estrus dan lama periode estrus pada kancil (*T. javanicus*) betina melalui pengamatan sitologi sel-sel epitel vagina.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Juli 2008 di kandang percobaan Unit Rehabilitasi Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Hewan Penelitian

Penelitian ini menggunakan dua ekor kancil (*T. javanicus*) betina dewasa dengan bobot badan 1,90 kg dan 2,20 kg. Untuk kandang

digunakan sebuah bangunan dengan ukuran 10x10 m². Kancil ditempatkan pada kandang individual yang berukuran 170x50x60 cm³ yang disekat menjadi dua petak (tiap petak diisi satu ekor). Kandang ini dilengkapi dengan tempat air minum dari plastik, tempat pakan terbuat dari kawat persegi empat memanjang dengan ukuran panjang, lebar dan tinggi masing-masing 40 cm, 10 cm dan 30 cm. Kandang diupayakan untuk dapat memberikan kenyamanan fisik dan kesehatan sesuai dengan syarat penelitian dan etika pemeliharaan dan penggunaan hewan untuk penelitian.

Pakan yang diberikan berupa irisan kacang panjang, daun kangkung, wortel dan pelet kelinci komersial sebagai pakan komplet, serta pemberian air minum *ad-libitum*. Selain itu, diberikan pula vitamin A, E, dan C. Pakan diberikan dua kali, pada pagi pukul 06.00 dan sore pukul 17.00 dengan berat basah makanan antara 564,11-571,56 g per hari per ekor (Jumaliah, 1999).

Ulas Vagina

Ulas vagina diambil setiap hari pada jam 07.00 pagi selama dua bulan. Sampel usapan vagina diambil pada lokasi kira-kira 2 cm dari vulva menggunakan kapas steril (*cotton swab*) yang dibasahi dengan NaCl fisiologis. Hasil usapan dioleskan pada gelas objek dan dibiarkan kering di udara terbuka. Setiap hari pengambilan ulas vagina dibuat sebanyak lima preparat ulas. Ulasan epitel vagina yang diambil dikeringkan dan dicelupkan dalam methanol. Pewarnaan dilakukan dengan Giemsa selama 45 menit (Rao *et al.*, 1979). Kriteria fase siklus estrus ditentukan berdasarkan persentase gambaran morfologi sel epitel yang teramati (Tabel 1). Fase diestrus ditetapkan bila sel-sel superfisial tidak ditemukan pada usapan vagina. Fase proestrus bila secara progresif

Tabel 1 Kriteria penentuan siklus estrus berdasarkan gambaran perubahan bentuk sel epitel.

No.	Fase Estrus	Sel Epitel	Bentuk Sel
1	Diestrus	Sel parabasal	Sel kecil, bulat dengan inti besar
2	Diestrus -proestrus	Sel intermediet	Sel bulat, lebih besar dari pada sel parabasal dengan inti lebih kecil
3	Proestrus - estrus	Sel intermediet/superfisial	Sel besar bentuk poligonal inti sangat kecil atau tanpa inti
4	Estrus	Sel Superfisial/ kornifikasi	Sel besar bentuk poligonal inti sangat kecil atau tanpa inti dan terjadi karatinisasi

persentase sel-sel intermediet/superfisial meningkat. Fase estrus ditemukan persentase sel-sel superfisial/kornifikasi mencapai maksimum pada ulasan epitel vagina. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran lensa objektif 40x. Perhitungan dilakukan sebanyak minimum 200 sel pada setiap sediaan yang diamati.

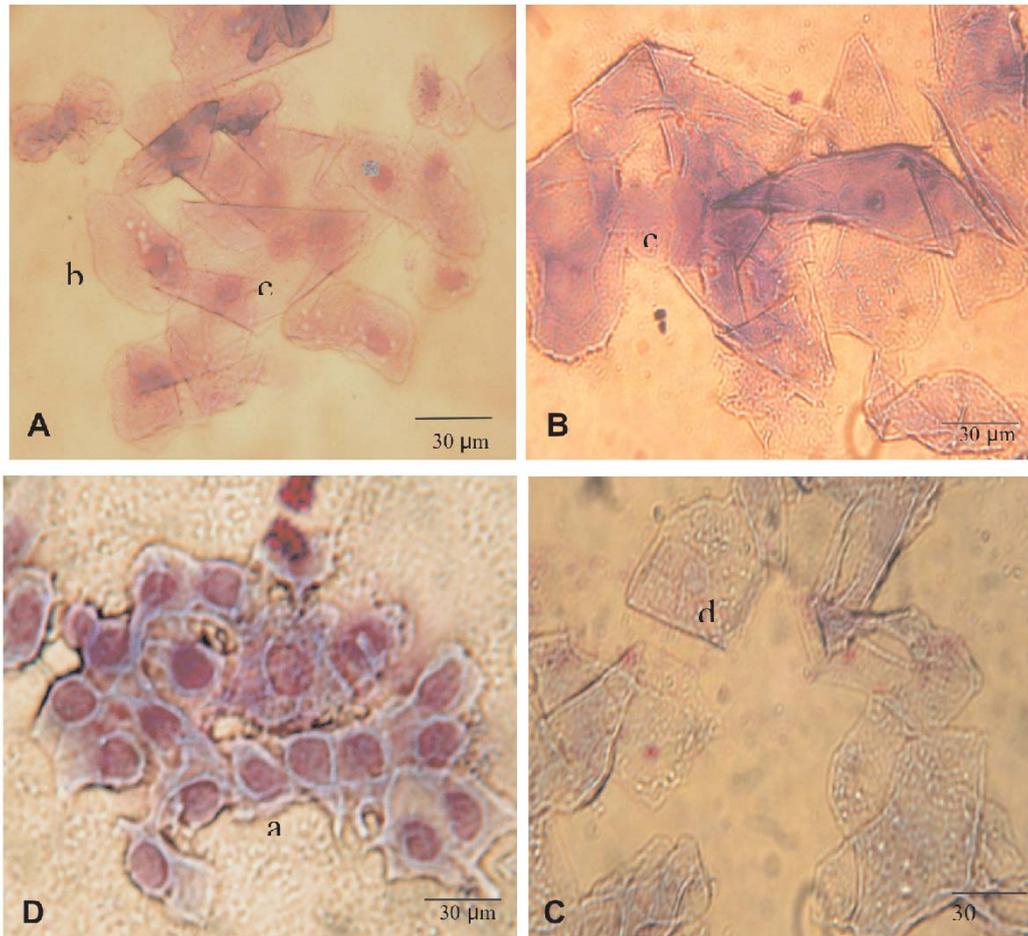
Sel-sel epitel vagina yang teramati kemudian dihitung menurut kelompok masing-masing fase siklus estrus yang telah ditentukan. Persentase masing-masing tipe sel ditabulasikan dan kemudian dianalisis secara deskriptif. Hasil pengamatan didokumentasikan dengan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi dengan kamera (Nikon FDX-35).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan terhadap morfologi sel-sel epitel vagina merupakan metode sederhana yang dapat digunakan oleh praktisi untuk mengkarakterisasi fase siklus estrus pada ternak dan untuk mengevaluasi berbagai penyakit saluran reproduksi (Dugweker *et al.*, 1978; Bishnoi *et al.*, 1982).

Pada penelitian ini ditemukan tiga macam sel-sel epitel vagina, yaitu sel-sel parabasal, intermediet, dan superfisial/kornifikasi (Gambar 1). Hasil ini sesuai dengan yang dilaporkan Boume (1990).

Berdasarkan patokan dan karakteristik estrus yang berasal dari epitel vagina kancil didapatkan kelompok dengan jumlah sel parabasal sebanyak 81,4%, sel intermediet, dan



Gambar 1. Morfologi sel epitel vagina kancil pada fase proestrus (A), fase estrus (B,C) dan diestrus (D). (a) sel parabasal, (b) sel intermediet, (c) sel superfisial mengalami kornifikasi dan (d) sel superfisial yang mengalami keratinisasi. Pewarnaan Giemsa, Bar = 30 µm.

superfisial sebanyak 18,6% dan sel kornifikasi 0%. Hal ini dikategorikan dalam fase diestrus/ anestrus. Fase proestrus didapatkan sel parabasal sebanyak 43,2% dan sel intermediet 56,8%. Pada fase estrus didapatkan sel superficial 13,7% dan sisanya 86,3% ditemukan sel keratinisasi (kornifikasi) (Tabel 2).

Sel parabasal adalah sel epitel kecil yang khas ditemukan pada ulasan vagina, bentuknya bulat atau membulat dan mempunyai inti yang relatif besar dibandingkan dengan sitoplasma. Sel-sel parabasal umumnya ditemukan pada saat diestrus dan anestrus dan tidak umum ditemukan awal proestrus serta tidak terdapat selama masa estrus. Pada fase proestrus, sel-sel epitel vagina yang teramati adalah sel-sel parabasal dan sel-sel intermediet. Sel-sel intermediet mempunyai bentuk dan ukuran yang bervariasi dan mempunyai diameter dua atau tiga kali lebih besar dari pada sel parabasal. Oleh karena itu banyak peneliti yang mensubklasifikasikan sel ini menjadi dua golongan, yaitu sel intermediet yang kecil dan sel intermediet yang besar. Sel intermediet ditemukan pada semua stadia siklus, kecuali pada saat estrus.

Pada fase estrus ditemukan sel-sel superfisial atau sel-sel tanduk yaitu sel-sel pipih yang berbentuk poligonal dan tidak memiliki inti atau inti yang piknosis. Secara umum, fase siklus estrus dapat dikelompokkan menjadi fase folikuler (proestrus dan estrus) dan fase luteal (diestrus dan anestrus). Fluktuasi kadar hormon selama siklus estrus akan berpengaruh terhadap gambaran sel epitel vagina. Pada fase luteal, hormon progesteron memelihara keadaan uterus sehingga pada keadaan ini (tidak estrus) sel-sel epitel yang ditemukan adalah sel-sel parabasal.

Pada fase estrus, hormon estrogen akan meningkatkan keaktifan dinding uterus, menyebabkan hipersekresi dan keratinisasi sel-sel epitel uterus dan vagina sehingga sel yang terikut dalam ulasan adalah sel-sel superfisial

atau sel tanduk (McDonald, 1980; Boume 1990). Dalam prakteknya, pemeriksaan sitologis ulasan vagina ini sering digunakan untuk menentukan siklus estrus dan waktu inseminasi yang terbaik.

Fase estrus pada kancil ditandai dengan adanya sekresi lendir yang cukup banyak pada vagina. Pada fase estrus ini, sel-sel epitel yang teramati adalah sel-sel superfisial/kornifikasi (Tabel 2). Jika sel-sel superfisial/kornifikasi ini ditemukan dalam jumlah banyak, menandakan hewan sedang berada dalam kondisi estrus (McDonald, 1980). Sel superfisial yang tidak berinti sering mengalami kornifikasi atau keratinisasi yang berfungsi untuk melindungi mukosa vagina dari iritasi saat kopulasi. Hilangnya inti sel epitel pada fase estrus kemungkinan juga karena proses keratinisasi. Sel-sel yang mengalami keratinisasi tampak sebagai individu-individu terpisah. Sel-sel tersebut kemudian berdegenerasi karena terhalangnya difusi nutrisi dari kapiler-kapiler di dalam jaringan ikat oleh lapisan keratin. Pada fase ini, deskuamasi dari sel-sel superfisial bisa juga terdeteksi.

Suraatmadja (1982) yang melakukan penelitian terhadap proses kornifikasi epitel vagina tikus melaporkan bahwa kemungkinan hormon estradiol berperan dalam proses keratinisasi melalui pembentukan butir-butir keratohialin, yang kemudian bertindak sebagai pusat-pusat proses desintegrasi filamen intraseluler. Salisbury *et al.*, (1978) melaporkan bahwa pada ulasan vagina sapi yang diambil tiga sampai lima hari sesudah estrus memperlihatkan pertambahan jumlah sel-sel yang mengalami kornifikasi.

Solis *et al.*, (2008) menyatakan bahwa sel-sel parabasal sangat dominan selama fase sebelum estrus pada domba, diikuti dengan sel-sel intermediet dan sel-sel superfisial, sedangkan pada saat estrus, sel-sel superfisial mendominasi.

Tabel 2 Karakteristik sel epitel vagina kancil

Fase Estrus	Sel parabasal %	Sel intermediet dan superfisial (%)	Sel Superfisial/ kornifikasi (%)
Diestrus/anestrus	81,4	18,6	0
Proestrus	43,2	56,8	0
Estrus	0	13,7	86,3

Memasuki fase diestrus populasi sel superfisial menurun dan sebaliknya terjadi peningkatan jumlah sel intermediet dan parabasal. Menjelang akhir diestrus terjadi degenerasi menyebabkan terbentuknya vakuola pada sitoplasma dan inti sel terdesak ke pinggir.

Anestrus adalah periode yang panjang dari siklus reproduksi. Pada kancil, fase ini ditandai dengan sekresi lendir (sedikit) dan kental atau tidak ada, serviks menutup dan mukosa vagina terlihat pucat. Pada fase ini sel-sel parabasal mendominasi, sedangkan sel-sel superfisial tidak ditemukan.

Nalley (2006) melaporkan siklus reproduksi dengan melihat perubahan sitologi vagina pada rusa timor (*Cervus timorensis*). Pada fase folikuler ditemukan sel superfisial dominan (92%) dan pada fase luteal sel parabasal dominan (86%) dari siklus estrus.

Dari hasil pengamatan harian selama dua bulan terdapat enam titik puncak jumlah sel-sel superfisial/kornifikasi, yaitu hari ke-1 (89%), hari ke-10 (88%), hari ke-23 (85%), hari ke-33 (87%), hari ke-45 (83%), hari ke-59 (86%), dengan jarak 10, 13, 10, 12, dan 14 hari dengan rata-rata 11,6 hari. Hal ini menunjukkan bahwa lama siklus estrus yang ditentukan berdasarkan persentase sel superfisial/kornifikasi adalah 11,6 hari dengan kisaran 10-14 hari.

Berdasarkan hasil pengamatan sel parabasal yang merupakan tanda hewan dalam keadaan fase luteal, ditemukan empat titik sel-sel parabasal, yaitu hari ke-5 (79%), hari ke-16 (81%), hari ke-28 (80%), hari ke-38 (84%), hari ke-52 (83%), dengan jarak 11, 12, 11 dan 14 dengan rata-rata 12 hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa lama siklus estrus yang ditentukan berdasarkan persentase sel basal dan parabasal adalah 12 hari dengan kisaran 11-14 hari.

Hasil penelitian ini berbeda dengan pernyataan Kudo *et al.*, (1997) yang memperkirakan siklus estrus pada kancil berlangsung 16 hari. Menurut Nalley (2006) hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa siklus estrus pada kancil sama dengan rusa *Rein* 9-12 hari, pada sapi 18-24 hari dan domba 14-20 hari (Toelihere, 1985).

Dari hasil penelitian ini ditemukan lama birahi pada kancil adalah 3 hari (48-60 jam) hal ini didasarkan pada persentase sel superfisial mulai meningkat hari -1 dan mencapai puncak pada hari ke-0 dan mulai menurun pada hari kesatu, hal ini sama dengan pernyataan Kudo *et al.*, (1997)

SIMPULAN

Dari hasil penelitian penentuan siklus estrus berdasarkan perubahan sitologis vagina kancil (*T.javanicus*) dapat disimpulkan:

Siklus estrus kancil dapat ditentukan dengan melihat perubahan sel-sel epitel vagina. Pada fase estrus sel superfisial/kornifikasi dominan (86,3%) dan pada fase luteal sel parabasal dominan (81,4%) dari siklus estrus.

Lama estrus adalah 3 hari (48-60 jam) dan lama siklus estrus yaitu 11,6 hari dengan kisaran 9-14 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono S, Korohmaru M, Adnyane IKM, Setijanto H, Sigit K. 2002. Distribusi glikoprotein pada testis kancil (*Tragulus javanicus*). *Seminar Nasional Bioteknologi Reproduksi*. Malang, 30-31 Maret 2002.
- Attia MA. 1998. Abstract. Cyclic changes in genital organs and vaginal cytology in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Dutsch Tierarzti wochenschr*. 105(11): 399-404.
- Bishnoi BL, Vyas KK, Dwaranath PK. 1982. Note on spinnbarkeit (???) and crystallization pattern of bovine cervical mucus during oestrus, Indian. *J Anim Behav Sci* 52: 438-440.
- Boume LD. 1990. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edited by Bancroft JD, Steven A and Turner DR. Ed. III Edinburgh. Churchill Livingstone. Pp. 465-492.
- Dugweker YG, Takkar OP, Roy KS, Sharma RD. 1978. Exfoliative vaginal cytology of murrh buffaloes during various stages cycle Indian. *J Anim Res* 12: 102-104.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos, Biotechnology In Agriculture Series*, Dublin-Ireland.
- Haron AW, Yong M, Zainudin ZZ. 2000. Evaluation of Semen Collected by Electroejaculation from Captive Lesser Mouse Deer Malay Chevrotain (*Tragulus javanicus*). *J of Zoo and Wildlife Medicine* 31:164-167.
- Hutchinson TC. 1970. Vaginal cytology and reproduction in the squirrel monkey (*Samiri sciureus*). *Folio Primat*. 12: 12-223.

- Jumaliah N. 1999. Pola perilaku, estimasi kuantitatif konsumsi dan daya cerna kancil (*Tragulus javanicus*) terhadap pakan di Kebun Binatang Ragunan Jakarta. [Tesis] Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Kudo H, Abdullah N, Ho YW, Jalaludin S, Hawa S, Fujuta H. 1995. Behavior and reproduction of captive lesser mouse deer (*Tragulus javanicus*) Malay. *J Anim Sci* 1:24-28.
- McDonald LD. 1980. Reproductive patterns of dogs. In: LE McDonnald Ed. *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 3rd ed. Philadelphia. Lea and Febiger Pp. 438-440.
- Möhle U, Heistermann M, Pahme R, Hodges JK. 2002. Characterization of urinary and fecal metabolite of testosterone and their measurement for assessing gonadal endocrine function in male nonhuman primates. *General and Comparative Endocrinology* 129:135-145.
- Nalley WMM. 2006. Kajian biologi reproduksi dan penerapan teknologi inseminasi buatan pada rusa timor (*Cervus timorensis*). [Disertasi] Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Onuma M, Suzuki M, Uchida E, Ohtaishi N. 2002. Annual changes in fecal estradiol-17 α concentration of the sun Bear (*Helarctos malayanus*) in Sarawak Malaysia. *J Vet Med Sci* 64(4): 309-313.
- Ralls K, Barasch C, Minkowski K. 1975. Behavior of captive mouse deer (*Tragulus napu*). *Z Tierpsychol* 37:356-378.
- Rao PR, Rao AR, Sreeraman PK. 1979. A note on the utility of vaginal cytology in oestrous cycle and certain reproductive disorder in bovines. *Indian J Anim Sci* 50: 156-161.
- Rosenblum LA, Nathan T, Nelson J, Kaufman ICH. 1967. Vaginal cornification cycles in the Squirrel monkey (*Saimiri sciurea*). *Folio Primat* 6: 83-91.
- Salisbury GW, VanDemark NL, Lodge JR. 1978. The reproductive system of the cow. Pp.35-51. In *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Catle*. 2nd edition. San Fransisco. WH. Freeman and Company.
- Solis G, Aguilera JI, Rincon RM, Banuelos R, Arechiga CF. 2008. Characterizing cytology (ECV) in ewes from 60 d of age through parturition. *J Anim Sci* 82, Suppl. 1.
- Strawder N. 2004. *Tragulus javanicus* (lesser mouse deer). The University of Michigan of Zoology.
- Suraatmadja TO. 1982. Cornification process in the vaginal epithelium of the laboratory rat (*Rattus norvegicus*) under the influence of oestradiol valerate: an electron microscope study. [Thesis]. Bogor. Institut Pertanian Bogor.
- Toelihere, MR. 1985. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Bandung. Angkasa
- Williams ES, Thorne ET, Kwiatkowski DR, Lutz K, Anderson SL. 1992. Comparative vaginal cytology of the estrous cycle of black-footed ferrets (*Mustela nigripes*), Siberian polecats (*M. eversmani*), and domestic ferrets (*M. putorius furo*). *J Vet Diagn Invest* 4: 38-44.