

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Reproduksi Ternak Sapi

Pengelolaan reproduksi merupakan bagian yang penting dalam dunia peternakan, karena daya reproduksi kelompok ternak akan baik jika diikuti dengan pengelolaan reproduksi yang baik. Harapannya akan menghasilkan efisiensi reproduksi yang tinggi dengan produktivitas ternak yang tinggi pula. Proses produksi dan reproduksi memiliki korelasi positif, dimana produksi yang meningkat hanya bisa dicapai bila ada perbaikan efisiensi reproduksi. Kondisi reproduksi akan menjadi indikator dalam penilaian efisiensi reproduksi menurut Hafez (2008).

Reproduksi adalah suatu fungsi tubuh yang secara fisiologis sangat penting bagi kelanjutan keturunan suatu jenis atau bangsa hewan (Toelihere, 1994). Proses reproduksi baru dapat berlangsung setelah hewan mencapai masa pubertas atau dewasa kelamin, dimana proses ini diatur oleh kelenjar-kelenjar endokrin dan hormon-hormon yang dihasilkan oleh organ serta kelenjar pada sistem reproduksi (Cole dan Cupps, 1980).

Seluruh aktivitas reproduksi baik hewan jantan maupun betina dipengaruhi oleh kerja hormon. Kerja hormon ini secara langsung maupun tidak langsung berpengaruh pada proses reproduksi. Pada hewan betina, mekanisme hormon reproduksi sangat penting untuk siklus reproduksi. Siklus reproduksi adalah rangkaian seluruh kejadian biologis mulai dari terjadinya perkawinan hingga lahirnya generasi baru makhluk hidup. Aktivitas reproduksi berlangsung secara terus-menerus baik pada hewan jantan maupun hewan betina (Partodiharjo, 1992).

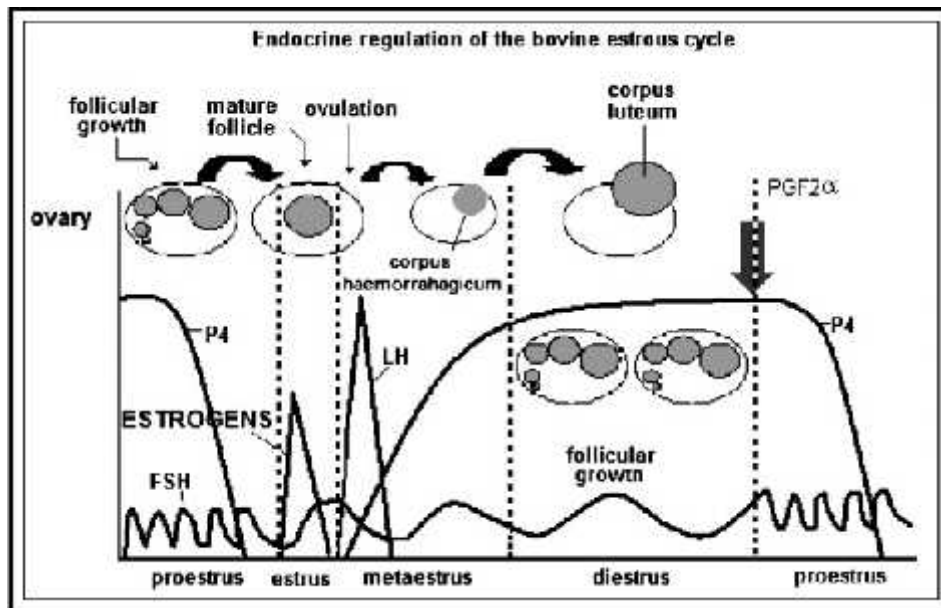
2.2 Folikulogenesis

Folikulogenesis merupakan suatu proses tahapan perkembangan folikel didalam ovarium yang melibatkan beberapa proses. Mulai dari rekrutment folikel primer, seleksi folikel, pertumbuhan folikel, pematangan folikel, hingga proses ovulasi (Campbell *et al.*, 2010). Proses perkembangan dan maturasi folikel diatur oleh pars distalis yang berada pada kelenjar hipofisa, yaitu dengan sekresi hormon Follicle stimulating hormone (FSH), Luteinizing hormone (LH) dan Prolaktin pada beberapa spesies. Folikulogenesis dimulai dari diambilnya folikel primordial dari suatu kumpulan yang berisi folikel-folikel yang sedang tumbuh dan berkembang dan berakhir saat proses ovulasi atau mati menjadi folikel atresi.

Perkembangan folikel ditandai dengan adanya gelombang pertumbuhan folikel. Satu gelombang folikel didefinisikan sebagai suatu proses pertumbuhan dari folikel yang dominan daripada beberapa folikel kecil lain. Dari kelompok folikel tersebut, salah satunya akan mengalami seleksi dan akan tumbuh menjadi folikel dominan, sedangkan folikel yang lain akan berhenti pertumbuhannya dan menuju atresi. Pada saat seleksi morfologis, folikel dominan mengandung estrogen dengan konsentrasi tinggi dalam cairan folikel. Setelah folikel dominan mencapai ukuran maksimal maka folikel tersebut nantinya juga akan mengalami atresi atau regresi. Atresi dari folikel dominan akan menyebabkan pertumbuhan gelombang folikel baru. Pada gelombang kedua, folikel dominan akan menjadi folikel anovulatory, sedangkan pada gelombang ketiga akan mengalami ovulasi. Setelah proses seleksi berakhir, maka gelombang folikel dominan akan banyak

mengandung mRNA untuk reseptor gonadotropin dan hormon steroid (Fortune *et al.*, 2001). Gelombang pertumbuhan folikel terjadi selama siklus estrus, sebelum pubertas, selama kebuntingan, dan periode post partus (Siregar, 2009).

Satu siklus estrus terdiri dari fase folikuler dan fase luteal. Pada fase folikuler ditandai dengan pertumbuhan dan perkembangan folikel ovarium yang berlangsung selama 3-4 hari sedangkan fase luteal ditandai dengan pematangan corpus luteum yang menghasilkan progesteron dengan konsentrasi yang mencapai puncak pada hari ke-6 setelah ovulasi, dan fase ini berlangsung kurang lebih 13 hari. Pada fase folikuler prostaglandin dihasilkan oleh endometrium uterus, sehingga corpus luteum lisis dan hormon progesteron menurun yang dijelaskan pada Gambar 2.1, turunnya progesteron menyebabkan kontrol umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior, sehingga hipotalamus mensekresikan Gonadotropin releasing hormone (GnRH) dan hipofisa anterior mensekresikan FSH dan LH, tingginya sekresi FSH dan LH merangsang pertumbuhan folikel yang berdampak meningkatnya hormon estrogen yang diproduksi oleh folikel. Folikel terus berkembang menjadi folikel antrum dan preovulasi sehingga estradiol mencapai level tertinggi dan menyebabkan kontrol umpan balik positif terhadap hipotalamus dan hipofisa sehingga level FSH dan LH mencapai puncak dan menyebabkan folikel preovulasi pecah dan terjadi ovulasi. Setelah ovulasi folikel pecah menjadi corpus hemorrhagicum kemudian menjadi corpus luteum yang menghasilkan hormon progesteron selama fase luteal (Sonjaya, 2005). Proses ini dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Profil Hormonal dan Aktifitas Ovarium Pada Sapi Betina Satu Siklus Birahi (Carlos, 2007).

2.3 Meiosis Resumption

Meiosis resumption merupakan proses re-inisiasi dari meiosis yang bergantung pada beberapa faktor eksternal. (Eppig, 1991). Meiosis adalah proses pembelahan sel yang terjadi pada sel-sel kelamin dari organisme yang mengadakan reproduksi secara generatif atau seksual. Pada dasarnya meiosis terdiri atas sekali duplikasi kromosom (DNA) yang diikuti oleh dua kali pembelahan (tanpa replikasi DNA), sehingga pada akhirnya dihasilkan sel-sel haploid (Subowo, 2011).

Meiosis terbagi menjadi 2 divisi yaitu meiosis 1 dan meiosis 2. Gamet dibutuhkan untuk proses reproduksi seksual dari organisme yang dihasilkan dari meiosis. Baik meiosis 1 maupun meiosis 2 terdiri dari empat fase: prophase, metaphase, anaphase, dan telophase. Tetrad homolog terbagi menjadi 2 sel dari akhir meiosis 1. Hasil kromosom bivalent dari 1 sel terbagi menjadi 2 sel, yang

terisi oleh kromatid dari tiap sel. Empat sel dari hasil meiosis 2 terbentuk dan terisi dengan kromatid tunggal dari tiap kromosom dari sel induk. Perbedaan utama antara meiosis 1 dan meiosis 2 adalah saat proses meiosis 1, terjadi kromosom yang saling silang pada fase prophase 1, yang mengakibatkan rekombinasi genetik dimana hal ini tidak terjadi pada meiosis 2 (Panawala, 2017).

Meiosis oosit mamalia pada umumnya diinisiasi saat masa perkembangan fetus dan tertahan pada fase diplotene dari fase pertama *meiotic prophase* saat masa kelahiran. Oosit mengalami *meiosis arrest* pada fase ini dalam kurun waktu seminggu hingga bahkan bertahun-tahun tergantung pada jenis spesies. Pada waktu pubertas, oosit yang hampir mencapai ukuran maksimal mendapatkan kemampuan untuk melanjutkan proses meiosis (Liang *et al*, 2007).

Maturasi oosit mamalia diinduksi oleh penarikan pengaruh penghambatan dari sel granulosa *in vivo* LH surge yang mengakibatkan kerusakan dari hubungan dari oosit dan sel granulosa pada folikel pre-ovulatori. Pada proses maturasi *in vitro*, terjadi proses pemindahan oosit imatur yang berasal dari folikel ke media maturasi. Hal ini dapat mengganggu transfer dari regulator dan penunjang metabolik yang penting untuk menjaga proses meiosis oosit. (Eppig, 1991).

Re-inisiasi dari meiosis diatur oleh beberapa perubahan dari pola fosforilasi dari beberapa protein dari kinase spesifik. Terutama berasal dari aktifitas *maturation promoting factor* (MPF) (Masui and Markert, 1971), yang merupakan regulator dari mitosis dan meiosis siklus sel secara universal (Nurse, 1990). Aktifasi dari MPF merangsang kondensasi dari kromosom, perusakan amplop nukelus (GVBD) dan persiapan sitoplasma untuk fase metaphase baik pada siklus mitosis

maupun meiosis (Murray, 1989; Murray and Kirschner, 1989; Motilik and Kubelba, 1990).

2.4 Maturasi dan Fertilisasi in vivo

Maturasi oosit didefinisikan sebagai inisiasi dan penyelesaian meiosis pertama dari tahap *germinal vesicle* (GV) menjadi metaphase II, dengan disertai pematangan sitoplasma untuk fertilisasi dan perkembangan awal embrio. Pematangan oosit secara konseptual dibagi menjadi pematangan nukleus dan pematangan sitoplasma. Pematangan nukleus mengacu pada kembalinya meiosis dan perkembangan menjadi metaphase II. Pematangan sitoplasma mengacu pada persiapan oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrio. Pematangan nukleus dikendalikan oleh pematangan sitoplasma (Chian *et al.*, 2003).

Oosit yang matang ditandai dengan sejumlah kriteria seperti adanya aktivitas *maturation promoting factor* (MPF) (Kakisina dan Indra, 2008; Rahman *et al.*, 2008), ekspansi sel-sel kumulus, *germinal vesicle break down* (GVBD), ekstrusi *first polar body* (Gordon, 2003), serta adanya influks Ca. (Chen *et al.*, 2013). Ekspansi sel-sel kumulus merupakan tanda oosit matur yang paling mudah terlihat. Ekspansi sel-sel kumulus sangat penting bagi keberhasilan fertilisasi karena dapat membantu migrasi spermatozoa di antara sel-sel kumulus (Hasbi, 2013).

Fertilisasi adalah suatu proses peleburan inti sel telur dengan inti spermatozoa (Sukra *et al.*, 1989) yang akan mengaktivasi sel telur (Burks dan Saling, 1992) dan membentuk pronukleus jantan dan betina yang akhirnya akan bersatu dan kemudian membelah, berkembang menjadi organisme baru (Balinsky, 1970; Hogan *et al.*,

1986). Proses ini tidak hanya terdiri dari satu tahapan saja, melainkan terdiri atas serangkaian tahapan yang dimulai dari masuknya (penetrasi) spermatozoa ke dalam sitoplasma sel telur (Austin dan Short, 1987).

Sel telur yang telah mengalami proses pematangan di ovarium mengalami proses ovulasi dan ditangkap oleh fimbriae pada bagian infundibulum tuba Fallopii, kemudian berpindah ke tempat dimana sel telur tersebut bertemu dengan sperma. Proses fertilisasi secara alami yang dikenal dengan fertilisasi *in vivo* berlangsung di ampulla tuba Fallopii (Cole dan Cupps, 1969; Toelihere, 1979; Austin dan Short, 1987; Sukra *et al.*, 1989).

2.5 Fertilisasi in vitro

Fertilisasi *in vitro* atau disebut juga *in vitro fertilisation* (IVF) merupakan bagian terpisah dari proses embryo transfer (ET) yang digunakan pada industri produksi embrio; proses ini terdiri dari maturasi *in vitro*, IVF, pengembangan embrio secara *in vitro*, dan transplantasi embrio pada uterus resipien. IVF juga merupakan proses yang penting untuk pembelajaran lebih dalam mengenai mekanisme pada fertilisasi *in vivo* (Garcia *et al*, 2016).

Teknologi IVF dapat digunakan untuk mempelajari permasalahan yang berhubungan dengan: maturasi oosit, kapasitas spermatozoa, aktivasi ovum, kontrol genome embrio, mekanisme dari pembelahan sel, pengaruh maternal dan genom paternal, interaksi antara nukleus dan sitoplasma, dan lain sebagainya (Garcia *et al*, 2016).

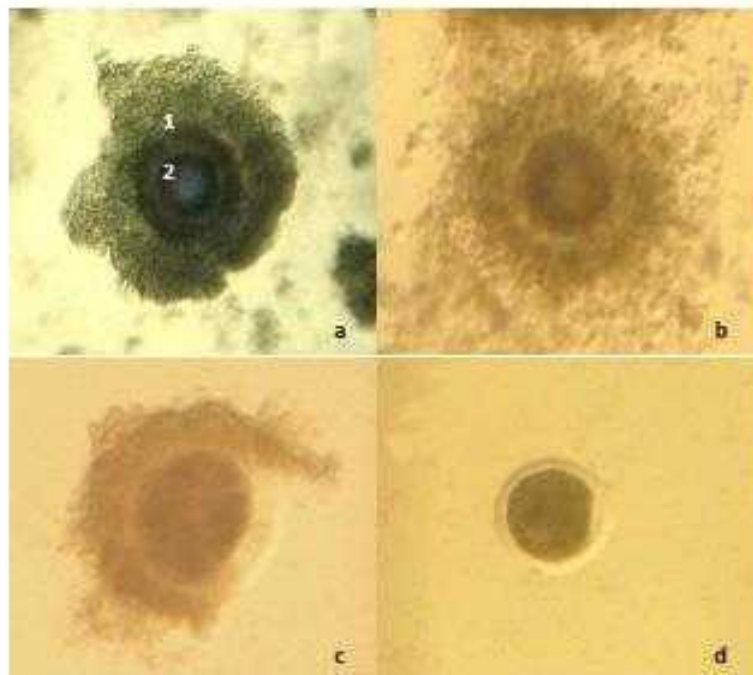
Pada hewan ternak, IVF memberikan beberapa keuntungan seperti produksi massal embrio unggul untuk disebarakan ke induk resipien yang secara genetik tidak unggul, kemampuan untuk memanfaatkan embrio dari sapi unggul dengan masalah fisik sehingga tidak memungkinkan untuk bunting atau sapi yang mempunyai masalah dengan sistem reproduksi, kemungkinan untuk produksi embrio pada sapi yang bunting pada trisemester pertama, serta produksi embrio dari sapi dara yang belum dewasa kelamin (Garcia *et al*, 2016).

Oosit dapat diperoleh via aspirasi folikel ovarium yang merupakan limbah RPH; kemungkinan lain, *ovum pick up* (OPU), yaitu teknik yang digunakan untuk memperoleh oosit yang berasal dari hewan donor, dapat pula digunakan untuk koleksi oosit sapi. Teknik ini memungkinkan untuk meningkatkan populasi sapi dengan keturunan genetik yang dikehendaki dari sapi betina yang mempunyai performan baik berdasarkan sifat yang kita inginkan (Pieterse, 1988).

2.6 Maturasi in vitro

Oosit dikelilingi oleh sel-sel granulosa yang disebut sel-sel kumulus membentuk kompleks kumulus oosit (COC) (Chian *et al.*, 2003). Kualitas oosit sangat berpengaruh terhadap tingkat maturasi yang dihasilkan. Kualitas oosit diklasifikasikan menjadi empat tipe, yaitu Kualitas A : Kumulus berlapis padat dengan lebih dari tiga lapisan dan ooplasma homogen; Kualitas B: Lapisan kumulus padat, satu sampai tiga lapis dengan ooplasma homogen, memiliki penampakan kasar dan zona pelusida yang berwarna lebih gelap; Kualitas C: Lapisan kumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki

lapisan gelap; serta kualitas D : Oosit gundul tanpa lapisan cumulus (Amer *et al.*, 2008) (Gambar 2.2). Oosit dengan morfologi bagus, yaitu sel kumulus berlapis-lapis, kompak, ooplasma homogen, penampilan COC terang dan transparan, serta adanya zona pelusida (ZP) yang padat menghasilkan lebih banyak oosit yang matang setelah *In vitro Maturation* (IVM) (Rahman *et al.*, 2008).



Gambar 2.2 Morfologi oosit sapi imatur. (a) oosit sapi Kualitas A, (b) oosit sapi Kualitas B, (c) oosit sapi Kualitas C, (d) oosit sapi kualitas D. (1) kumulus ooporos, (2) ooplasma oosit (Budyanto, 2013).

Maturasi oosit meliputi maturasi inti dan maturasi sitoplasma. Struktur kromatin dalam oosit imatur melewati suatu proses penyusunan morfologi yang dimulai pada profase pembelahan meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase kedua (Kusindarta, 2009). Metaphase kedua ditandai dengan migrasi kortika granula ke oolemma, peningkatan mitokondria dan lipid droplet, akan menyebabkan perubahan susunan aparatus golgi dan keberadaan retikulum

endoplasmik granular, aktivitas *Maturation Promoting Factor* (MPF) dan metabolisme oosit (Rahman dkk., 2006).

Pematangan inti oosit dapat dievaluasi dengan pewarnaan seperti aceto-orcein (Shirazi dan Sadeghi 2007), sedangkan pematangan sitoplasma dapat diketahui secara tidak langsung antara lain dari terjadinya reaksi korteks, pembentukan pronukleus, dan pembelahan sel (Ducibella *et al.* 2002).

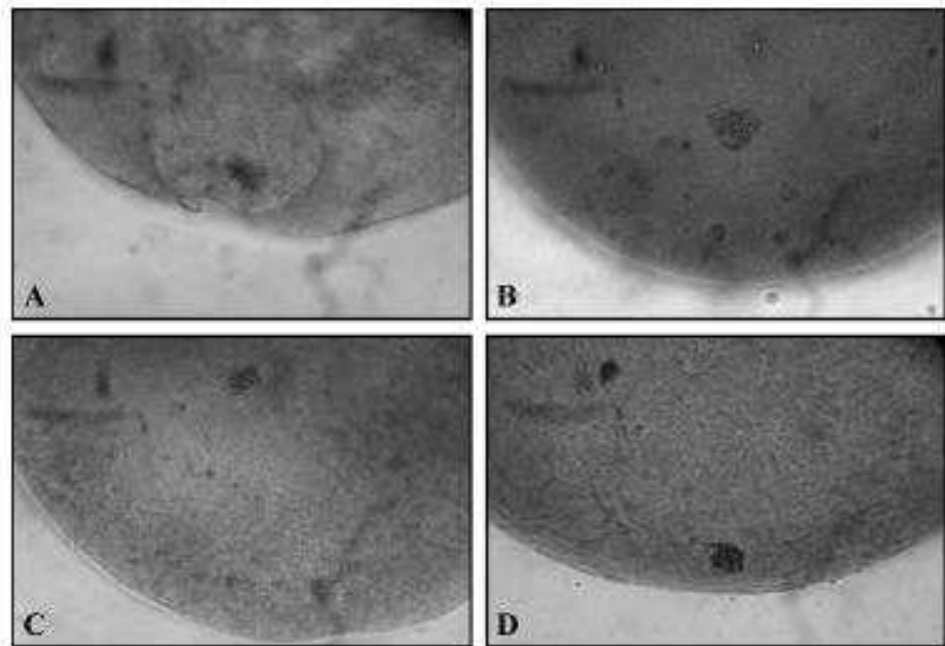
Oosit dan sel kumulus yang dihubungkan *gap junction* menunjukkan bahwa sel-sel granulosa mengontrol GVBD melalui sel kumulus. *Gap junction* mengatur regulasi molekul seperti steroid, Ca^{2+} , inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), cAMP, dan purin untuk bebas berada pada antar sitoplasma oosit dan sel kumulus. Sintesis protein dibutuhkan untuk perkembangan oosit dari tahap GV ke MII, serta untuk pemeliharaan mempertahankan MII. Protein sitoplasma, MPF, dan faktor sitostatik mengatur pematangan inti oosit (Chian *et al.*, 2003).

Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke *metaphase II*. Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan *vesicle* membentuk GV kemudian mengalami pelepasan membran inti membentuk GVBD. Setelah GVBD terjadi, kromosom dibungkus oleh *mikrotubulus* dan *mikrofilamen* yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap *metaphase I* (MI). Pada oosit sapi, *metaphase I* terjadi setelah 12-14 jam inkubasi dan diikuti oleh tahap *anaphase I* (AI) dan *telophase I* (TI) yang berlangsung relatif singkat (14-18 jam) setelah masa inkubasi (Chohan, 2003).

Tahap *metaphase* II (MII) akan terjadi dan ditandai dengan terbentuknya *polar body* I dan oosit yang sudah matang siap untuk difertilisasi (Gordon, 2003) (gambar 2.3).

Maturasi sitoplasma oosit mencakup kejadian-kejadian pada kemampuan oosit untuk melengkapi pematangan inti, fertilisasi dan awal embriogenesis serta mempersiapkan suatu dasar untuk implantasi, inisiasi kebuntingan dan perkembangan fetus normal (Bravini-Gandolfi and Gandolfi, 2001; Sirard *et al.*, 2006).

Maturasi sitoplasma meliputi beragam metabolik dan modifikasi struktural, termasuk peristiwa yang menjamin terjadinya pembuahan normal, meiosis mitosis untuk progresi siklus sel, dan aktivasi jalur diperlukan untuk program genetik dan epigenetik dari perkembangan embrio praimplantasi (Combelles *et al.*, 2002). Maturasi sitoplasma juga meliputi akumulasi protein mRNA, perkembangan regulasi Ca²⁺, perubahan aktivitas dari *maturation promoting factor* (MPF), *mitogen activated protein kinase* (MAPK) dan redistribusi organel seluler (Anguita *et al.* 2007). Hal ini dibutuhkan untuk mencapai kemampuan perkembangan oosit dan juga membantu kemampuan perkembangan embrionik (Bravini-Gandolfi and Gandolfi, 2001; Sirard *et al.*, 2006; Watson 2007).



Gambar 2.3 Klasifikasi oosit dengan pewarnaan aceto orcein. (a) Germinal vesikel (GV); (b) germinal vesikel breakdown (GVBD); (c) metafase I (MI); (d) metafase II (MII). Dengan perbesaran 100 x (Prentice-Biensch *et al.*, 2012).

2.7 Urea Nitrogen

Pada ternak ruminansia terdapat mikroba dalam saluran pencernaannya salah satunya dalam rumen. Mikroba dalam rumen merubah pakan melalui proses enzimatik pada pakan yang dikonsumsi ternak, termasuk protein. Protein pakan yang masuk kedalam rumen akan difermentasi oleh mikroorganisme proteolitik. Mikroorganisme proteolitik tersebut menghasilkan enzim proteolitik seperti protease, peptida, dan deaminase untuk mendegradasi protein menjadi asam amino, peptida dan amonia (Pamungkas dkk, 2008). Ketika pakan masuk kedalam rumen, fraksi NPN akan seketika berubah menjadi amonia (NH_3). Amonia yang dihasilkan akan digunakan oleh mikroba rumen untuk berkembang biak dan menjadi sumber

protein pada ternak. Sebagian amonia dibawa darah ke hati dan kemudian dikonversi ke urea (Gulliński *et al.*, 2014).

Asam amino adalah perantara utama dalam degradasi dan asimilasi N dalam rumen. Penggunaan amonia memungkinkan mikroba rumen mendaur ulang sejumlah besar urea dari metabolisme perantara, sebagai sumber N untuk sintesis protein mikroba, bila jumlah energi yang tersedia cukup. Kompleks nitrogen lainnya juga dapat didaur ulang melalui air liur atau lapisan rumen seperti metabolit purin dan mucoprotein. Adaptasi evalusioner ruminansia ini secara efektif mengurangi N minimal yang dibutuhkan dan meningkatkan waktu bertahan hidup hewan yang kekurangan gizi (Nolan dan Dobos, 2005).

Amonia merupakan sumber N utama bagi mikroba untuk sintesis protein mikroba rumen. Konsentrasi amonia yang tinggi di dalam rumen menunjukkan proses degradasi protein pakan lebih cepat daripada proses pembentukan protein mikroba sehingga terjadi akumulasi NH_3 (McDonald *et al.*, 2002). Protein pakan yang mengalami degradasi di dalam rumen akan kehilangan fungsinya sebagai sumber asam amino karena proses deaminasi akan memisahkan gugus amonia dari rantai karbon utamanya (Haryanto, 2012).

Daur ulang urea secara signifikan berhubungan dengan produksi NH_3 dan penyerapan saluran pencernaan pada ruminansia. Keseluruhan NH_3 diserap melalui epitel rumen, mukosa usus halus, dan mukosa usus besar yang melalui vena porta masuk ke dalam hati, Bagian jaringan NH_3 juga masuk ke hati. Metabolisme hati memiliki peran pokok dalam integrasi metabolisme N. Amonia didetoksifikasi dalam hati dengan cara mengkonversi menjadi urea, yang kemudian urea dapat

didaur ulang langsung ke dalam rumen, usus halus, atau usus besar, urea ini dapat masuk ke dalam rumen rumen dalam saliva, diekskresikan oleh ginjal atau susu dan keringat (Alio *et al.*, 2000).

NH₃ bebas pada mitokondria akan berikatan dengan CO₂ dan H₂O yang dibantu dengan 2ATP akan bereaksi yang kemudian akan membentuk carbamyl phosphate, kemudian carbamyl phosphate akan memberikan gugus karbamoil kepada ortinin untuk membentuk sitrulin dan membebaskan fosfatnya, dalam suatu yang dikatalisis oleh ornitin transkarbamoilase yang terdapat pada bagian mitokondria sel hati, yakni enzim mitokondria hati yang memerlukan Mg²⁺. Sitrulin yang terbentuk kemudian meninggalkan mitokondria menuju ke dalam sitosol sel hati. Gugus asam amino kedua hadir dalam bentuk L-aspartat yang sebaliknya diberikan dari L-glutamat oleh kerja aspartat transaminase. L-glutamat tentu menerima gugus asam amino dari asam amino umum lainnya oleh transmisi menjadi α-ketoglutarat. Pemindahan gugus amino kedua ke sitrulin dengan adanya ATP, untuk membentuk aginosuksinat. Reaksi ini dikatalisa oleh arginosuksinat sintetase sitosol hati, suatu enzim yang tergantung kepada Mg²⁺ (Faqih, 2012).

Sitrulin bereaksi dengan asam aspartat membentuk asam argininosuksinat. Reaksi ini berlangsung dengan bantuan enzim argininosuksinat sintese. Dalam reaksi tersebut ATP merupakan sumber energi dengan jalan melepaskan gugus fosfat dan berubah menjadi AMP (Faqih, 2012).

Kadar MUN berbanding lurus dengan kadar BUN. Dalam suatu penelitian kadar urea dalam plasma atau susu lebih dari 18 mg/dl dapat menurunkan *conception rate* (Ferguson *et al.*, 1993; Butler *et al.*; 1996; Nourozi *et al.*, 2010).

2.8 Uremia

Ureum adalah salah satu produk pemecahan protein dalam tubuh yang disintesis di hati dan 95% dibuang oleh ginjal dan 5% dibuang dalam bentuk feses. Secara normal kadar ureum dalam darah berkisar 7-25 mg dalam 100 mililiter darah. Kadar ureum juga sering disebut sebagai Blood Urea Nitrogen (BUN) dan jika dikonversi menjadi ureum maka rumus yang digunakan adalah:

$$\text{Ureum} = 2,2 \times \text{BUN (milligram per desiliter)}$$

Pada pengukuran konsentrasi urea darah, bila ginjal tidak cukup mengeluarkan ureum maka ureum darah meningkat di atas kadar normal 20-40 mg per 100cc darah karena filtrasi glomerulus harus turun sampai 50% sebelum kenaikan kadar urea darah terjadi. Meningkatnya kadar urea darah (BUN) dan kreatinin merupakan salah satu indikasi kerusakan pada ginjal. Semakin buruk fungsi ginjal, semakin tinggi kadar ureum darah. Kadar ureum yang melebihi nilai normal kadar ureum dalam darah maka akan mengalami keracunan ureum atau uremia (Nursalam, 2006).

Saat konsentrasi ammonia melebihi dari kapasitas detoksikasi dari hati, konsentrasi dari ammonia di seluruh tubuh meningkat dan akan memberikan efek toksik pada sel mamalia (Guyton, 1996). Ada hipotesis mengatakan bahwa ammonia dan konsentrasi urea tinggi akan merusak fertilitas melalui efek toksik langsung pada sperma, ovum, implantasi dan perkembangan embrio (McEvoy *et al*, 1997; Sinclair *et al*, 2000). Area sistem reproduksi yang berpotensi mempunyai efek langsung dari urea atau ammonia adalah oviduct, uterus dan poros hipotalamus-pituitari-gonad. Plasma urea tinggi atau tingkat ammonia dapat

merubah kondisi lingkungan uterus (Hadley, 1992), tetapi mekanisme dimana gradien pH bisa mempengaruhi fertilitas masih belum diketahui pasti (Nurchayoh. H, 2003). Peningkatan gradien pH pada lingkungan uterus dapat merubah komposisi dari sekresi uterus dan hal ini dapat memperburuk perkembangan embrio (Mader, 1998). Butler (1998) menunjukkan bahwa urea dapat merubah baik gradien pH pada seluruh sel uterus dan meningkatkan sekresi dari prostaglandin F2a yang sangat mungkin akan mengganggu perkembangan embrio. Peningkatan tingkat plasma urea juga akan sangat mungkin mengganggu nilai progesterone di dalam lingkungan mikro dari uterus, yang akan mengakibatkan kondisi suboptimal bagi perkembangan embrio (Wahyuningsih, 2001).

Konsentrasi plasma urea atau ammonia tinggi dapat mengurangi ikatan LH pada reseptor di ovarium, mengakibatkan penurunan dari laju ovulasi dan mengurangi produksi progesterone (Hadley, 1992).

2.9 Kematian sel

Setiap sel melakukan metabolisme untuk mempertahankan fungsi dan struktur normalnya yang dikenal dengan homeostasis normal. Sel akan beradaptasi apabila mendapat stimulus fisiologik, morfologik, dan patologik, yaitu perubahan sel sebagai reaksinya, sehingga sel dapat bertahan hidup dan mengatur fungsinya. Bila stimulus patologik lebih besar hingga melampaui adaptasi sel maka timbul jejas sel atau *cell injury* yang biasanya bersifat sementara (*reversible*). Namun bila stimulus tetap berlangsung atau bertambah besar, sel akan mengalami jejas *irreversible* yang mengakibatkan kematian sel (Sudiono dkk., 2003).

Morfologi kematian sel dibagi menjadi dua, yaitu nekrosis dan apoptosis (Sudiono dkk., 2003). Nekrosis merupakan tipe kematian sel yang sering ditemukan dengan ciri *cellular swelling*, denaturasi dan koagulasi protein, dan *organellar breakdown* (Mitchell dkk., 2008). Saat sel mengalami nekrosis akan terjadi perubahan pada sel dan nukleus. Sel nekrosis menunjukkan warna lebih eosinofil karena hilangnya warna basofil yang dihasilkan oleh RNA pada sitoplasma, serta meningkatnya pengikatan eosin oleh protein intrasitoplasmik yang rusak (Sudiono dkk., 2003). Terdapat tiga perubahan pada inti sel yang mengalami nekrosis, yaitu: (1) kariolisis, basofilia dan kromatin nampak memucat. Perubahan ini merupakan refleksi aktivitas DNA-ase akibat derajat keasaman (pH) sel yang menurun, (2) piknosis yaitu inti sel berkerut, pada keadaan ini DNA tampak menjadi padat dan masa basofil menjadi padat dan berkerut, (3) karioreksis, inti sel yang piknosis terfragmentasi atau sebagian piknosis yang terfragmentasi (Sudiono dkk., 2003). Sel nekrosis sering dihubungkan dengan kondisi patologis akibat kondisi iskemia, trauma, paparan toksin, rangsang kimia dan *neurodegenerative disorders* (Alvarez dkk., 2010).

Dua proses utama yang menyebabkan perubahan pada nekrosis adalah pencernaan oleh enzim di dalam sel dan denaturasi protein. Jika denaturasi protein lebih berpengaruh pada proses nekrosis, maka terjadi nekrosis koagulativa, namun, bila pencernaan oleh enzim katalitik pada sel lebih berpengaruh, maka terjadi nekrosis liquefaktif atau nekrosis kolikuativa (Sudiono dkk., 2003).

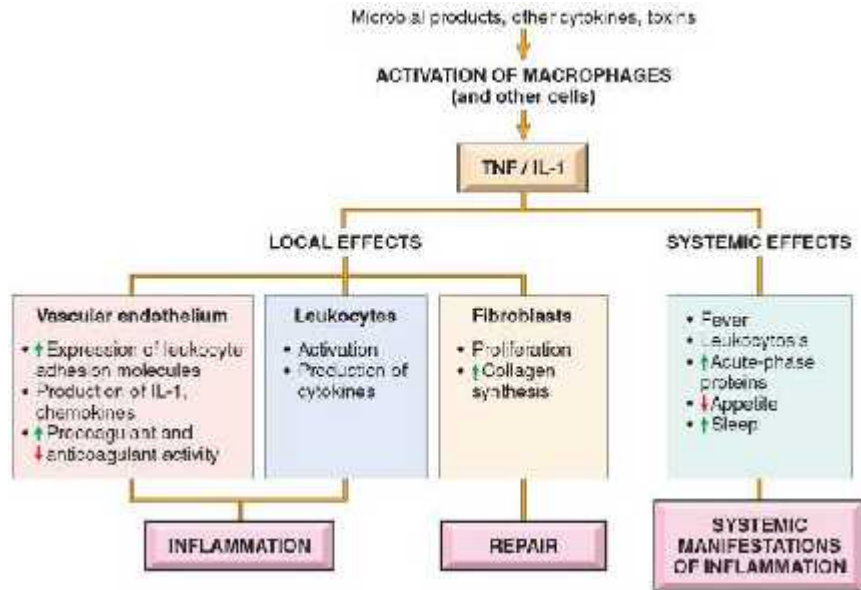
Terdapat beberapa mekanisme cedera sel secara biokimia, yakni deplesi ATP yang terjadi karena hilangnya sintesis ATP yang mengakibatkan penutupan jalur

homeostasis, lalu deprivasi oksigen, hilangnya homeostasis kalsium, defek permeabilitas membran plasma, dan kerusakan mitokondria. Kerusakan-kerusakan ini dapat mengakibatkan penutupan jalur homeostasis, aktivasi fosfolipase, 10 protease, ATPase, serta endonuclease yang akan mempercepat kematian sel. Membran plasma yang dapat langsung dirusak oleh toksin bakteri, virus, komponen komplemen, agen fisik maupun kimiawi dapat merubah permeabilitas membrane karena hilangnya sintesis ATP atau aktivasi fosfolipase (Robbins *et al*, 2007).

3.0 TNF- dan Interleukin 1 sebagai Indikator nekrosis sel

TNF- adalah salah satu sitokin yang dapat mengindikasikan adanya kerusakan pada hati akibat zat toksik, karena selain dihasilkan oleh makrofag, sel endothelial, dan sel mast, TNF- juga bisa dihasilkan oleh sel yang terjejas akibat zat toksik yang menyebabkan peradangan dan kerusakan pada hati. TNF- adalah sitokin pleiotropik dengan fungsinya yang beragam, yang bisa dijumpai juga pada penyakit-penyakit patologis seperti kanker, penyakit jantung, dan diabetes mellitus type-2 (DMT2) (Simona *et al.*, 2005).

TNF- dapat berfungsi sebagai biomarker peradangan dan sebagai indikator penting untuk intervensi terapi (Shoelson, 2006). Sekresi TNF dan IL-1 dapat dirangsang oleh endotoksin dan produk mikroba lainnya, kompleks imun, cedera fisik, dan berbagai rangsangan inflamasi.



Gambar 2.4 Peran TNF dan Interleukin-1 pada efek lokal dan efek sistemik (Robbins *et al.*, 2010).

Peran TNF dan IL-1 yang terpenting dalam proses inflamasi adalah efek pada endothelium, leukosit, dan fibroblas, serta induksi reaksi sistemik pada fase akut, peran TNF dan IL-1 (Gambar 2.4). Secara khusus TNF dan IL-1 menginduksi ekspresi molekul adhesi endotel, sintesis mediator kimia, termasuk sitokin lain, chemokines, faktor pertumbuhan, eikosanoid, dan NO (Robbins *et al.*, 2010).

3.0.1 Tumor Necrosis Factor-

Sitokin dikeluarkan selama tahapan efektor dari imunitas bawaan dan imunitas yang didapat melalui berbagai sel dan jaringan. Meskipun sitokin bereaksi pada konsentrasi yang sangat rendah (pg/ml), efeknya sangat berhubungan dengan tingkat sirkulasinya. Deregulasi dari ekspresi gen yang meningkatkan produksi sitokin dapat mengubah homeostasis sebuah organisme, yang mengakibatkan kegagalan organ spesifik atau bahkan kegagalan sistemik. Ketidakseimbangan

sitokin berperan dalam patogenesis dari patogen penyakit infeksi yang berbeda dan penyakit inflamasi. TNF bersama sitokin lainnya, telah dijelaskan mempunyai peranan utama didalam proses ini. (Jimena Cuenca, 2001, Ifor R. Williams, 2008).

TNF merupakan suatu kelompok protein yang terdiri atas limfotoksin a (Lta) dan limfotoksin b (ltb). Meskipun sel T dapat memproduksi TNF, monosit yang teraktivasi dan makrofag merupakan sumber utama TNF, yang disintesis sebagai pro protein 20 kDa dan dibelah oleh TNF, mengubah enzim menjadi monomer 17 kDa. Dibawah kondisi fisiologis, TNF bersirkulasi sebagai homotrimer stabil berbentuk kerucut yang memediasi efeknya dengan mengikat dua molekul reseptor, TNFRI (p55) dan TNFRII (p75). TNFRI dianggap sebagai jalur dominan dan telah diimplikasikan dalam sebagian besar efek TNF yang sudah diketahui, termasuk induksi pada aktivitas makrofag, upregulasi dari molekul, kohesi, dan aktivasi *nuclear factor kB* (Jimena Cuenca, 2001; Ifor R. Williams, 2008).

Pada pertengahan 1980-an, protein TNF telah dimurnikan dan gennya telah *Inning*, dirangkaikan, dan dipetakan pada *Major Hystocompatibility Complex* (MHC) regio klas III pada lengan pendek kromosom 6. Gen TNF kedua-duanya disusun dengan a dan Ltb didalam lokus TNF, sebuah regio 7kb sentromerik 250kb hingga pada lokus HLA B, telomerik 400 kb hingga ke lokus C2/13F dan 1000kb dari klas MHC II gen DR (Jimena Cuenca, 2001).

Tumor Necrosis Factor a (TNF-) merupakan salah satu anggota dari TNF superfamily, saat ini ditemukan 19 anggota dengan 29 reseptornya, dapat menginduksi proliferasi, diferensiasi, survival dan apoptosis. TNF- adalah *hormon-like polypeptide* multifungsional (*pleiotropic cytokine*), memodulasi

berbagai gene yang terlibat dalam inflamasi, infeksi dan keganasan. Makrofag adalah sumber utama TNF- α . Akan tetapi oosit, corpus luteum, sel teka dan sel granulosa juga telah diteliti mengandung TNF- α dan mRNA-nya. TNF- α mempunyai 2 reseptor: *Tumor Necrosis Factor* receptor 1 atau TNFR1 (juga dikenal sebagai TNFRSF1, CD120a, p55TNFR, P60) dan bentuk yang lebih besar (p80/p75) sebagai *Tumor Necrosis Factor* receptor 2 atau TNFR2 (juga dikenal sebagai TNFRSF1b, CD120b, p75TNFR, P80). (Kartosen, Haris A., *et al.* 2007).

Tumor Necrosis Factor telah dihubungkan dengan efek biologi spektrum luas, dan merupakan faktor pertama yang terlibat dalam arus sitokin yang meningkatkan inflamasi dan berguna dalam mengaktifkan makrofag pada pertahanan *host* terhadap mikroba yang menginvasi selama terjadinya infeksi. Sehingga TNF dapat memediasi baik efek menguntungkan dan efek merugikan tergantung pada keadaan proses penyakitnya. *Tumor Necrosis Factor* kini diketahui terlibat dalam merangsang produksi sitokin, meningkatkan ekspresi molekul adhesi dan aktivasi netrofil juga merupakan stimulator tambahan untuk aktivasi sel T dan produksi antibodi oleh sel B. (Jimena Cuenca, 2001, Baz *et al.*, 2008).

Meskipun tingkat sirkulasi level TNF sangat bervariasi, upregulasi dari ekspresi gen telah dilibatkan dalam patogenesis berbagai jenis penyakit dengan komponen inflamasi, autoimun, proses infeksi akut dan kronis. (Jimena Cuenca, 2001).

3.0.2 Interleukin-1

Interleukin-1 adalah sitokin polipeptida yang dihasilkan pada proses inflamasi dengan spektrum aktivitas imunologik luas. Beberapa penelitian menunjukkan peranan IL-1 sebagai mediator inflamasi penyakit dengan onset akut dan kronik. IL-1 juga berperan mengontrol limfosit, sedangkan peran IL-1 dalam proses peradangan secara umum bersifat tidak spesifik. Kelompok IL-1 (IL-1 gene family) terdiri dari 3 jenis yaitu IL-1 α , IL-1 β , dan IL-1 receptor antagonist(IL-1Ra). Interleukin-1 α dan IL-1 β bersifat agonis menimbulkan reaksi radang atau disebut sitokin proinflamasi. Interleukin-1 receptor Antagonist bersifat menghambat efek biologis IL-1 atau disebut sitokin antiinflamasi. Peningkatan produksi IL-1 oleh sel mononuklear sudah dikemukakan pada beberapa kondisi patologis seperti kolitis dan kanker kolorektal. Interleukin-1 juga merupakan mediator penting dalam proses inflamasi (Akagi *et al*, 1999).

Interleukin-1 adalah salah satu monokin. Sumber utama IL-1 adalah monosit dan makrofag. Sel-sel jenis lain seperti keratosit (sel epidermis), sel LGL (NK cells), sel dendritik, astrosit, mikroglia, limfosit B dan fibroblast dapat menghasilkan IL-1, walaupun sedikit, setelah mendapatkan rangsangan oleh sejumlah zat tertentu, sifat perangsangan yang terjadi menentukan apakah IL-1 dilepaskan atau tetap berada dalam sel (Subowo, 2009). Interleukin 1 terbagi atas dua protein, yaitu IL-1 α dan IL-1 β , yang terdiri dari dua gen yang berbeda, tetapi mengenali permukaan reseptor yang sama. Terkecuali pada keratinosit pada kulit, beberapa sel epitel, dan beberapa sel dari sistem saraf pusat, IL-1 tidak diproduksi oleh sel pada orang yang sehat. Namun, sebagai respon terhadap adanya infeksi,

akan terjadi peningkatan kadar IL-1 yang diproduksi oleh makrofag dan beberapa sel lainnya (Subowo, 2009).

Fungsi utama IL-1, mirip dengan TNF, adalah sebagai mediator respon inflamasi terhadap infeksi dan stimulus lainnya. Interleukin-1 bekerja bersama-sama dengan TNF sebagai innate immunity and inflammation. Sumber utama IL-1, seperti juga TNF, adalah sel-sel fagosit mononuklear yang teraktifasi. Produksi IL-1 oleh makrofag diinduksi oleh produk bakteri seperti LPS dan oleh sitokin lainnya misalnya TNF. Tidak seperti TNF, IL-1 juga diproduksi oleh sel-sel lain selain makrofag, misalnya netrofil, sel epitel (seperti keratinosit), dan sel endotel (Abbas, Lichtman, Pillai, 2007).

Hasil penelitian dengan menggunakan metode imunohistokimia membuktikan adanya IL-1b, IL-1RA, IL-1RI dan IL1RII pada oosit dan sel granulosa dari folikel primordial, primer, dan folikel sekunder. Pada antral folikel kecil maupun antral folikel besar, protein-protein ini ditemukan pada oosit, sel cumulus, dan mural granulosa. Analisis western blot mengkonfirmasi protein dari sistem IL-1 ada pada sel granulosa dari folikel antral sapi (Passos *et al*, 2016).