

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



**PENINGKATAN FERTILITAS SAPI PERAH YANG BERPRODUKSI
TINGGI AGAR BERANAK SETIAP TAHUN MELALUI UJI FERTILITAS
IN VITRO**

Tahun ke-1 dari rencana 3 tahun

**Suzanita Utama, drh., MPhil., PhD. (0002106104)
Dr. Tita Damayanti Lestari, drh., MSc. (0002106002)
Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS. (0016055206)**

**DIBIAYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN TERAPAN UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PTUPT)**



KIC
KIC
LP 08/19
Utg
P

**PENINGKATAN FERTILITAS SAPI PERAH YANG BERPRODUKSI
TINGGI AGAR BERANAK SETIAP TAHUN MELALUI UJI FERTILITAS
IN VITRO**

Tahun ke-1 dari rencana 3 tahun

Suzanita Utama, drh., MPhil., PhD. (0002106104)
Dr. Tita Damayanti Lestari, drh., MSc. (0002106002)
Prof. Dr. Ismudiono, drh., MS. (0016055206)

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
NOMOR : 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENINGKATAN FERTILITAS SAPI PERAH YANG BERPRODUKSI TINGGI AGAR BERANAK SETIAP TAHUN MELALUI UJI FERTILISASI IN VITRO

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : drh. SUZANITA UTAMA, Ph.D
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
NIDN : 0002106104
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Kedokteran Hewan
Nomor HP : 08563253815
Alamat surel (e-mail) : suzanitautama@hotmail.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : TITA DAMAYANTI LESTARI
NIDN : 0002106002
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga


Anggota (2)

Nama Lengkap : Dr. drh. ISMUDIONO M.S
NIDN : 0016055206
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 3 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 525,000,000

Mengetahui,
Dekan FKH Universitas Airlangga



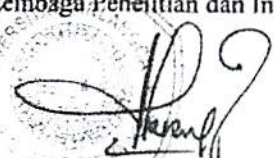
(Prof. Dr. Pudji Sianto, drh., M.Kes)
NIP/NIK/195601051986011001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
Ketua,



(drh. SUZANITA UTAMA, Ph.D)
NIP/NIK 196110021990022001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, MSi., PhD.)
NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

PENINGKATAN FERTILITAS SAPI PERAH YANG BERPRODUKSI TINGGI AGAR BERANAK SETIAP TAHUN MELALUI UJI FERTILISASI *IN VITRO*

Suzanita Utama, Tita Damayanti Lestari dan Ismudiono

Fertilitas pada sapi perah merupakan unsur penting dalam usaha peternakan sapi perah, karena reproduksi bagian tidak terpisahkan dari sistem reproduksinya. Peternak mengandalkan penghasilan dari usaha sapi perah dari produksi susu dan progeninya. Namun hasil survei pendahuluan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa apabila peternak memfokuskan usahanya untuk meningkatkan produksi susu dengan meningkatkan kuantitas dan kualitas pakan, ternyata berdampak buruk pada sistem reproduksinya. Sebaliknya apabila peternak berupaya agar sapi perahnya mempunyai calving interval satu, maka produksi susu tidak dapat mencapai kapasitas optimal. Eksplorasi referensi tentang pengaruh pakan *high protein* menimbulkan dugaan adanya peranan *milk urea nitrogen* (MUN), sebagai hasil sampingan metabolisme protein pakan sapi perah yang menyebabkan gangguan maturasi oosit, fertilisasi dan implantasi.

Penelitian Tahun ke-1 (2018) diawali dengan pengumpulan susu dan sampel darah dari sapi perah dengan kriteria produksi susu tinggi namun efisiensi reproduksinya rendah (serum 1), dan sapi perah dengan produksi standar namun efisiensi reproduksi baik (serum 2). Pengambilan darah dilakukan pada saat sapi perah birahi. Sampel serum diperiksa kadar estrogen, IGF-1, albumin, glukosa dan kolesterol. Sampel susu diperiksa kadar MUN (*milk urea nitrogen*). Luaran penelitian Tahun ke-1 adalah ditemukannya kadar hormon estrogen, IGF-1 albumin, glukosa dan kolesterol pada sapi bunting dan tidak bunting, juga angka maturasi oosit tertinggi pada uji *in vitro* setelah suplementasi urea dalam media maturasi. Hasil terbaik pada penelitian Tahun ke-1 dilanjutkan dengan uji fertilisasi *in vitro* pada penelitian Tahun ke-2 (2019). Luaran yang diharapkan adalah ditemukannya pengaruh kandungan urea dalam media maturasi dan/atau fertilisasi terhadap angka fertilisasi, angka cleavage, dan angka pembentukan blastula pada uji *in vitro*. Penelitian Tahun ke-3 (2020) dilakukan elektroforesis 2-Dimensi pada serum terbaik hasil penelitian Tahun ke-1 dan Tahun ke-2, untuk mengidentifikasi, isolasi dan karakterisasi bahan bioaktif serum, serta potensinya secara *in vitro*. Luaran yang diharapkan adalah ditemukannya bahan bioaktif teruji *in vitro* yang dapat memicu fertilitas ovum sapi perah yang produksi susunya tinggi, agar mampu beranak sekali dalam satu tahun.

Kata kunci: Serum, produksi susu, maturasi oosit, fertilisasi *in vitro*, calving interval

PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan yang maha kuasa dengan telah dimulainya penelitian kami berjudul **Peningkatan Fertilitas Sapi Perah yang Berproduksi Tinggi Agar Beranak Setiap Tahun Melalui Uji Fertilisasi *In Vitro***. Terimakasih kami sampaikan kepada Kemenristek Dikti atas pendanaan tahun pertama yang diberikan sehingga penelitian ini dapat terlaksana. Terima kasih juga kami sampaikan kepada ketua dan seluruh staf LPI Universitas Airlangga yang telah memfasilitasi pengajuan proposal penelitian skema PUPT tahun 2018-2020 ini. Tak lupa terimakasih juga kami sampaikan kepada para peternak mitra PT Greenfields Indonesia, di Dusun Precet, Desa Sumber Suko, Kecamatan Wagir, Kabupaten Malang, yang telah memberikan ijin pengambilan darah dan susu sebagai sampel penelitian.

Laporan akhir tahun penelitian tahun pertama ini meliputi penelitian yang telah kami laksanakan mulai bulan Januari sampai November 2018.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam memajukan peternakan sapi perah di Indonesia terutama dalam pencapaian target efisiensi reproduksi yang maksimal, untuk itu besar harapan kami penelitian tahun kedua dan ketiga juga akan mendapatkan pendanaan.

Kami menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna untuk itu masukan sangat kami harapkan.

Surabaya, 12 November 2018

Tim Peneliti

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
BAB 4. METODE PENELITIAN	9
BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI	14
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	16
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	17
DAFTAR PUSTAKA	18
LAMPIRAN	20

DAFTAR TABEL

	halaman
Tabel 5.1. Kadar MUN, Glukosa, Albumin, dan Kholesterol (rata-rata \pm SEM) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting	14
Tabel 5.2. Kadar Estrogen (rata-rata \pm SEM) pada Saat Birahi (D0), Hari ke-7 (D7), dan Hari ke-22 (D22) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting	14
Tabel 5.3. Kadar IGF1 (rata-rata \pm SEM) pada Saat Birahi (D0), Hari ke-7 (D7), dan Hari ke-22 (D22) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting	14
Tabel 5.4. Tingkat Maturasi Oosit (% , rata-rata \pm SEM) Sapi secara in Vitro setelah Suplementasi Urea Urea dalam Media Maturasi	15

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1. Pengukuran Kadar IGF-1 Serum	20
Lampiran 2. Pengukuran Kadar Estradiol Serum	21
Lampiran 3. Pembuatan Media Diseksi	22
Lampiran 4. Pembuatan Media Maturasi	23
Lampiran 5. Data Kasar Angka Maturasi	24
Lampiran 6. Statistik Penelitian	25

BAB 1. PENDAHULUAN

Konsumsi susu di Indonesia saat ini masih rendah yaitu sekitar 5,5 kg/kapita/tahun dibandingkan standar yang ditetapkan badan pangan dunia (FAO) sebesar 6,4 kg/kapita/tahun. Seiring dengan peningkatan kesejahteraan daya beli susu masyarakat diprediksi akan terus meningkat. Namun ketersediaan susu untuk memenuhi kebutuhan masyarakat sampai saat ini pasokan susu nasional hanya mampu mencukupi 30 persennya, sekitar 70 persennya masih mengandalkan impor. Ketersediaan susu dari dalam negeri sangat tergantung pada populasi dan produktivitas sapi perah.

Produksi susu sapi perah merupakan bagian tidak terpisahkan dari siklus reproduksi. Penelitian pendahuluan telah dilakukan pada populasi sapi perah di wilayah Kemitraan PT Greenfield di Dusun Precet, Desa Sumber suko, Kecamatan Wagir, Kabupaten Malang. Sejumlah sapi perah yang produksi susunya diatas rata-rata pada sapi perah yang produktif (produksi susu lebih dari 30 liter per hari), menunjukkan angka *services per conception* (jumlah perkawinan untuk menghasilkan kebuntingan) adalah 4-5, artinya untuk menghasilkan satu kebuntingan membutuhkan tiga kali dikawinkan. Interval siklus birahi sapi perah rata-rata adalah 21 hari, yang berarti membutuhkan waktu 84-105 hari. Dengan masa kebuntingan 278-284 hari (sekitar sembilan bulan), ditambah *days open* (birahi pertama setelah melahirkan) yang normalnya adalah 85-115 hari, maka sapi perah yang demikian tidak akan dapat memberikan kelahiran satu anak per tahun (*calving interval* satu). Pemeriksaan melalui palpasi rektal didapatkan kondisi korpus luteum lebih kecil dan lebih lunak. Studi literatur menunjukkan bahwa sapi perah yang beproduksi tinggi dan reproduksi rendah memiliki kadar *milk urea nitrogen* (MUN) yang tinggi, sebaliknya sapi perah dengan *calving interval* satu pada umumnya produksi susunya rendah dan kadar MUN-nya rendah (Jackson *et al.*, , 2011). Pada kelompok sapi perah yang produksi susunya rata-rata dengan inseminasi buatan menggunakan produk semen beku yang sama dan oleh inseminator yang sama, memiliki efisiensi reproduksi yang baik dengan *calving interval* satu (beranak sekali dalam setahun). Berdasarkan hal tersebut, diduga infertilitas

(kegagalan fertilisasi dan implantasi) pada sapi perah yang memproduksi tinggi disebabkan faktor dari induk itu sendiri.

Secara *in vivo*, fertilisasi terjadi apabila ovum yang telah matang diovulasikan dan dibuahi oleh spermatozoa. Pematangan oosit sampai menjadi ovum yang diovulasikan melibatkan hormon progesteron, estrogen, PRL dan IGF-1. Kinerja hormon-hormon tersebut memerlukan peranan sejumlah enzim pada proses sintesisnya, sedangkan enzim-enzim tersebut tersedia melalui proses sintesis protein sebagai bagian dari ekspresi gen. Sintesis protein sangat dipengaruhi oleh ketersediaan asam amino dan ko-faktor lainnya secara berkeselimbangan yang berasal dari nutrisi. Peneraan kadar berbagai hormon reproduksi dapat dilakukan di Sub Lab Endokrinologi Laboratorium Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, yang telah beroperasi rutin sejak tahun 1991, dan menjadi bagian dari Unit Layanan Diagnostik Fakultas Kedokteran Hewan, Unair.

Fertilisasi *in vitro* adalah upaya meniru fenomena fertilisasi *in vivo* dalam skala laboratorium untuk berbagai tujuan. Fertilisasi *in vitro* terdiri dari proses maturasi oosit *in vitro*, preparasi dan kapasitasasi spermatozoa, sampai inseminasi *in vitro* serta kultur embrio *in vitro*. Penelitian dengan teknik fertilisasi *in vitro* telah berjalan dengan baik di Sub Laboratorium Fertilisasi *In Vitro*, Laboratorium Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Unair sejak tahun 1992. Beberapa penelitian fertilisasi *in vitro* pada ternak antara lain untuk menguji suplementasi media dengan serum sapi birahi pada media maturasi oosit (Mustofa dkk, 1996), pada media fertilisasi *in vitro* (Mustofa dkk., 1999; Mahaputra dkk., 2002), dan penggunaan ko-kultur monolayer sel-sel kumulus dan epitel tuba Fallopii (Utama 1997 ; Utama dkk., 2002).

Berdasarkan uraian tersebut direncanakan serangkaian penelitian untuk mengetahui profil berbagai substansi dalam serum yang berasal dari nutrisi, yang bersifat memacu (*positive feedback*) maupun menghambat (*negative feedback*) terhadap fertilitas ovum melalui uji fertilisasi *in vitro*. Serum dieksplorasi dari serum sapi perah yang produksi susu tinggi dan efisiensi reproduksi rendah, dibandingkan sapi perah yang produksi susunya standar (rata-rata) dan efisiensi reproduksi baik. Hasil akhir

penelitian ini diharapkan dapat menemukan bahan bioaktif dalam serum untuk mempertahankan produktivitas susu tetap tinggi dan dapat beranak setiap tahun.

Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang permasalahan tersebut, maka dirumuskan permasalahan penelitian sebagai berikut :

1. Apakah terdapat perbedaan kadar *milk urea nitrogen* (MUN), estrogen, IGF-1, albumin, glukosa dan kholesterol dalam serum sapi perah yang memproduksi tinggi dan efisiensi reproduksi rendah, dibandingkan sapi perah yang produksi susunya rata-rata dan efisiensi reproduksi baik (Tahun ke-1).
2. Apakah suplementasi media maturasi oosit dengan urea akan menurunkan angka maturasi oosit *in vitro* dibandingkan dengan maturasi oosit *in vitro* tanpa suplementasi urea (kontrol)? (Tahun ke-1).
3. Apakah suplementasi media maturasi dan/atau fertilisasi *in vitro* dengan urea akan menurunkan angka fertilisasi dan perkembangan embrio dibandingkan tanpa suplementasi urea (kontrol)? (Tahun ke-2).
4. Bahan bioaktif apakah yang dapat diidentifikasi, diisolasi dan dikarakterisasi berdasarkan elektroforesis dua dimensi yang berperan dalam fertilisasi *in vitro* pada sapi perah yang memproduksi susu tinggi? (Tahun ke-3)

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Manajemen nutrisi memegang peran yang sangat penting dalam peternakan sapi terutama sapi perah, Pemberian pakan dengan kadungan tinggi protein dapat menstimulasi produksi susu tinggi (Nourozi *et al.*, 2010) akan tetapi peningkatan protein pakan justru dapat merugikan performa reproduksi hewan (Guo *et al.*, 2004). Jordan *et al.*, (1983) dalam Biswajit *et al.*, (2011) menyatakan bahwa Amonia, urea atau produk toksik lain yang berasal dari metabolisme protein dapat menghambat efisiensi reproduksi. Amonia akan masuk ke dalam rumen dan secara cepat di hidrolisa oleh bakteri urease menjadi urea, sehingga konsentrasi urea rumen meningkat. Urea tidak akan digunakan secara efisien oleh ruminansia kecuali oleh RDP (*Rumen Degradable Protein*) untuk memenuhi kebutuhan mikroorganisme rumen. Kelebihan konsentrasi RDP akan dapat menurunkan produksi dan efisiensi pemanfaatan N (Biswajit *et al.*, 2011). Konsentrasi amonia atau urea rumen akan ditangkap oleh mikroba rumen dan diabsorpsi melewati dinding rumen masuk ke pembuluh darah. Sehingga faktor pemberian pakan tinggi protein dapat meningkatkan transfer urea ke dalam darah. Kemudian urea di filter dari darah melalui arteri oleh ginjal dan di ekskresikan melalui urin (Biswajit *et al.*, 2011). Roseler *et al.*, (1993) menyatakan bahwa urea berdifusi keluar dan masuk kelenjar mammae seimbang dengan jumlah urea di darah. Sehingga proporsi MUN (Milk Urea Nitrogen) seimbang dengan BUN (Blood Urea Nitrogen). Selain itu ada 3 sumber utama urea di dalam susu yaitu, produk akhir protein, digesti NPN, dan katabolisme asam amino di kelenjar mammae (Biswajit *et al.*, 2011)

Beberapa efek negatif pada pakan tinggi protein terhadap reproduksi antarlain adalah menurunkan fungsi ovarium dan kemungkinan bunting pada perkawinan pertama berkurang, menurunkan fertilitas (Jackson *et al.*, 2011). Kadar MUN yang tinggi dapat menurunkan tingkat kebuntingan, kadar amonia akan meningkat sehingga menunda pembersihan kontaminasi uterus dan menurunkan fungsi sistem imun, menurunkan sekresi K, Mg, dan P pada sapi laktasi, dan menurunkan kadar progesteron pada periode yang sama (Rajala-Schultz *et al.*, 2001). Kandungan urea yang tinggi

dapat merubah pH uterus dan aktifitas *Carbonic Anhydrase* selama fase luteal (Biswajit *et al.*, 2011). Konsentrasi MUN ideal untuk sapi secara individu adalah 8-25 mg/dL. Sedangkan konsentrasi MUN optimal untuk kawanan sapi adalah sebesar 12-17 mg/dL (Hwang *et al.*, 2000). Menurut Nourozi *et al.*, (2010) sapi dengan kadar MUN diatas 18 mg dL memilik fertilitas lebih rendah (10%) daripada sapi dengan nilai MUN dibawah 12mg dL.

Pakan pada sapi digunakan untuk hidup pokok juga untuk berproduksi meliputi reroduksi dan laktasi (NRC, 2001). Nutrisi digunakan sebagai sumber energi pada sapi. Ketidakseimbangan energi pada sapi laktasi dapat menurunkan tingkat kebuntingan. Sapi laktasi dengan BCS bagus, dapat mengurangi asupan pakan, dan keseimbangan energi lebih baik, sehingga tersedia energi yang cukup untuk bereproduksi (Pryce, 2004).

Manajemen pakan merupakan salah satu faktor untuk memperbaiki sistem reproduksi pada sapi perah (Nourozi *et al.*, 2010). Pakan harus mengandung semua nutrien yang dibutuhkan oleh tubuh ternak, namun tetap dalam jumlah yang seimbang. Nutrien yang dibutuhkan oleh ternak antara lain karbohidrat, lemak, protein, vitamin, air dan unsur anorganik serta mineral (Sunarso dan M.Christianto, 2009). Pemberian pakan protein yang tinggi dapat menstimulasi produksi susu dan mempengaruhi fertilitas dari ternak tersebut yaitu meningkatnya *day open*, *s/c*, *calving interval* dan menurunnya *conception rate*.

Tingginya pakan protein dapat meningkatkan kadar urea dalam darah (BUN : *blood urea nitrogen*) dan urea dalam susu (MUN : *milk urea nitrogen*). Urea merupakan hasil metabolisme protein, yang dihasilkan dari detoksifikasi amonia rumen oleh hati. Kemudian didistribusikan oleh pembuluh darah dan berdifusi secara pasif dalam organ-organ dan cairan dalam tubuh. Maka tidak sedikit dalam sebuah peternakan sapi yang berskala besar menggunakan susu untuk mengukur kadar MUN sebagai indikator monitoring dalam membantu penggunaan efisiensi protein dalam pakan (Arunivipas, 2004). Kadar BUN sangatlah berkorelasi dan berbanding lurus dengan kadar MUN (Melendez *et al.*, 2000).

Kadar urea dalam plasma atau susu >18 mg d/L dapat menurunkan *conception rate* (Nourozi *et al.*, 2010; Butler *et al.*, 1996; Ferguson *et al.*, 1993). Tingginya kadar BUN yang mempunyai efek negatif pada fertilitas dapat dijelaskan dari beberapa mekanisme. Pakan protein yang tinggi dapat menyebabkan meningkatnya kadar urea dalam uterus sehingga menurunkan pH uterus pada fase luteal dan tidak dalam fase estrus (Elrod dan Butler, 1993) dan menurunkan konsentrasi P, Mg, K pada fase luteal. Hal ini dapat mempengaruhi perkembangan dan daya hidup embrio, dikarenakan pada fase luteal (H +7) implantasi dan plasentasi belum terbentuk, sehingga bergantung pada sekresi uterus sebagai nutrisi (Rhoads *et al.*, 2004). Konsentrasi urea nitrogen juga mempengaruhi hormon reproduksi.

Tingginya pakan protein dan urea nitrogen dapat menghasilkan korpus luteum yang lunak dan mudah pecah, sehingga menurunkan kadar progesteron dan menurunkan *binding* luteinizing hormon (LH) (Arunivipas, 2004). Menurunnya kadar LH dapat menyebabkan turunnya kadar progesterone. Dalam review Roy *et al.*, (2011) juga menyebutkan bahwa efek negatif dari urea nitrogen yaitu menurunkan hormon insulin. Yang mana hormon insulin sangat berpengaruh terhadap proses *steroidogenesis* yaitu pada aktifitas aromatase P450 dan mempengaruhi sekresi estradiol (E2) (Sartori *et al.*, 2013).

Menurunnya kadar progesterone dalam serum darah berhubungan dengan menurunnya konsentrasi *insuline-like growth factor-1* (IGF-1), dikarenakan IGF-1 merupakan stimulator produksi progesterone oleh sel luteal. Selain itu, IGF-1 *berpengaruh* dalam proses perkembangan folikel dan differensiasi. Menurunnya kadar IGF-1 dapat mengubah produksi estradiol pada ovarium, hal ini dapat mempengaruhi tingkah laku selama estrus (Spicer, 1990). Selain itu, pakan tinggi protein juga meningkatkan kadar Zn pada uterus, yang mana dapat menurunkan kapasitas *binding* progesterone pada receptor. Progesterone sangat penting dalam mempengaruhi perjalanan embrio dari tuba falopii menuju uterus, sekresi *uterine fluid* oleh endometrium, dan menjaga kebuntingan tetap kondusif (Habib *et al.*, 1980; Arunivipas, 2004). Kondisi-kondisi tersebut dapat menyebabkan gangguan terhadap

maturasi oosit, fertilisasi dan implantasi, yang selanjutnya menyebabkan kegagalan terjadinya kebuntingan pada sapi perah.

Fertilisasi *in vitro* adalah upaya meniru fenomena fertilisasi *in vivo* dalam skala laboratorium untuk berbagai tujuan. Penelitian-penelitian dengan teknik fertilisasi *in vitro* dengan berbagai tujuan telah berjalan dengan baik di laboratorium tersebut sejak awal tahun 1990 (Mahaputra dkk, 1992). Hal ini didasarkan pada hasil-hasil penelitian sebelumnya di Laboratorium yang sama. Fertilisasi *in vitro* pada sapi menghasilkan angka *cleavage* berkisar antara 57,1% sampai dengan 75%. Mustofa dkk. (1999b) mendapatkan angka *cleavage* sebesar 58,71% dengan suplementasi 10% serum sapi Friesian Holstein (FH) birahi pada media maturasi oosit untuk meningkatkan perolehan oosit matang. Utama dkk. (2002) mendapatkan angka *cleavage* sebesar 60,3% dengan perlakuan pemberian ko-kultur menggunakan monolayer sel-sel kumulus dan epitel tuba Falopii. Angka *cleavage* tertinggi, sebesar 75% dicapai dengan suplementasi media maturasi oosit dengan kombinasi FSH-LH-Estrogen (Mahaputra dan Mustofa, 2002). Penelitian fertilisasi *in vitro* dengan beberapa perlakuan pada spermatozoa sapi untuk mendapatkan embrio dengan jenis kelamin yang dikehendaki menghasilkan angka *cleavage* sebesar 57,1% (Mahaputra dan Mustofa, 2001). Pada kelompok kontrol didapatkan angka *cleavage* dengan rerata $38,07 \pm 5,23\%$. Data tersebut menunjukkan bahwa angka *cleavage* pada kelompok kontrol pada uji ini relatif tidak jauh berbeda dibandingkan kontrol penelitian-penelitian yang telah dilakukan pada sapi maupun pada kambing di laboratorium yang sama. Hal ini berarti hasil fertilisasi *in vitro* kelompok kontrol sudah cukup optimal, dapat dipakai sebagai pembanding terhadap kelompok perlakuan. Penelitian sebelumnya pada kelompok kontrol, angka *cleavage* pada fertilisasi *in vitro* sapi sebesar 38,9% (Mahaputra dan Mustofa, 2002).

Teknologi fertilisasi *in vitro* terdiri dari beberapa tahap, yaitu maturasi oosit, preparasi spermatozoa, dan inseminasi *in vitro* (Mahaputra dan Mustofa, 2000). Maturasi oosit merupakan satu tahap penting dalam rangkaian fertilisasi *in vitro*. Keberhasilan maturasi oosit *in vitro* sangat menentukan keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Hanya oosit yang matang yang akan berhasil dibuahi oleh spermatozoa (Mahaputra dan

Mustofa, 2000). Oosit sapi dapat diperoleh dengan aspirasi folikel berpenampang 2 - 8 mm pada ovarium dengan menggunakan jarum 18 G yang dihubungkan dengan alat suntik yang berisi cairan pencuci oosit (*dissection media*). Oosit yang didapat masih memerlukan proses pematangan untuk mencapai stadium metafase II (memiliki *plate* metafase dan *polar body* I). Pertumbuhan *in vitro* tersebut membutuhkan media dengan suplementasi hormon gonadotropin dan steroid (Hafez dan Hafez, 2000), agar kondisi lingkungannya sesuai dengan kondisi fisiologis yang terjadi *in vivo*. Oosit yang telah matang yaitu pada tingkat metafase II, sama dengan oosit yang baru mengalami ovulasi sehingga siap bersingami dengan spermatozoa. Suplementasi serum sapi birahi dapat dilakukan untuk meningkatkan hasil proses pematangan oosit, sehingga perkembangan embrio lebih baik setelah oosit matang tersebut diinseminasi *in vitro* (Mahaputra dkk, 1998 ; Mustofa dkk, 1999 ; Restiadi, 2001).

Preparasi spermatozoa dilakukan untuk mendapatkan sel spermatozoa dengan motilitas tinggi sehingga mempunyai kemampuan membuahi (Mahaputra dan Mustofa, 2000). Sebagai persiapan untuk inseminasi, semen beku terlebih dahulu dicairkan kembali di dalam air hangat 37°C selama satu menit untuk kemudian dicuci dengan pencuci semen (*calcium free media*). Setelah pencucian, spermatozoa dilakukan kapasitasi dalam medium fertilisasi selama 1 jam, baru diambil 5 - 20 µl (tergantung konsentrasi sel spermatozoa motil) dengan mikropipet untuk dimasukkan dalam tetes medium fertilisasi (Mahaputra dan Mustofa, 1999 ; Restiadi, 2001). Selain dengan medium di atas, kapasitasi dan fertilisasi sel spermatozoa dapat pula dilakukan dengan memakai larutan EBSS (Mahaputra dan Mustofa, 1999).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Tujuan Penelitian

Tujuan Umum :

Menemukan komposisi serum yang tepat untuk menghasilkan fertilisasi tertinggi dengan menggunakan teknik fertilisasi *in vitro*.

Tujuan Khusus:

1. Menemukan perbedaan kadar *milk urea nitrogen* (MUN), estrogen, IGF-1, albumin, glukosa dan kolesterol dalam serum sapi perah yang memproduksi tinggi dan efisiensi reproduksi rendah, dibandingkan sapi perah yang produksi susunya rata-rata dan efisiensi reproduksi baik (Tahun pertama).
2. Mengetahui pengaruh penambahan urea dengan konsentrasi 18 dan 36 mg/dl kedalam media maturasi oosit terhadap tingkat kematangan oosit *in vitro* (Tahun pertama)
3. Mengetahui pengaruh penambahan urea dengan konsentrasi 18 dan 36 mg/dl kedalam media maturasi dan/atau fertilisasi terhadap tingkat kematangan oosit angka fertilisasi dan perkembangan embrio *in vitro* (Tahun kedua).
4. Menemukan bahan bioaktif yang berperan dalam fertilitas *in vitro* pada sapi perah yang memproduksi susu tinggi (Tahun ketiga).

Manfaat Penelitian

Manfaat keilmuan:

Menemukan pemahaman baru bahwa pada pemeliharaan sapi perah harus memperhatikan aspek homeostasis (keseimbangan) dan optimalisasi antara produksi susu dan efisiensi reproduksi

Manfaat praktis:

Pemerintah/KUD/peternak dapat menerapkan pemanfaatan bahan bioaktif hasil penelitian ini melalui formula pemberian untuk produksi susu optimal dan sapi perah induk beranak sekali dalam setahun.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian dengan rancangan acak kelompok, menggunakan populasi sapi perah milik Kemitraan PT Greenfields Indonesia, di Dusun Precet, Desa Sumber Suko, Kecamatan Wagir, Kabupaten Malang. Sampel penelitian terdiri dari dua kelompok masing-masing sepuluh ekor induk sapi perah produktif, yaitu kelompok pertama sapi perah dengan kriteria produksi susu tinggi namun efisiensi reproduksinya rendah, dan kelompok kedua sapi perah dengan produksi standar namun efisiensi reproduksi baik, yaitu beranak satu tahun sekali. Data untuk melakukan pengelompokan didasarkan pada studi pendahuluan pada catatan (*recording*) produksi (hasil pemerahan pagi dan sore), serta catatan efisiensi reproduksi masing-masing sapi perah (*services per conception*, *days open*, dan *calving interval*).

Penelitian ini direncanakan tiga tahun, yaitu tahun 2018-2020. Luaran penelitian Tahun ke-1 (2018) adalah ditemukan korelasi antara komposisi serum sapi perah birahi terhadap kematangan oosit *in vitro*. Luaran penelitian Tahun ke-2 (2019) adalah ditemukannya angka fertilisasi, angka *cleavage*, pembentukan morula dan blastosis tertinggi. Luaran penelitian Tahun ke-3 (2020) adalah ditemukannya bahan bioaktif untuk peningkatan fertilitas sapi perah produksi susu tinggi beranak setiap tahun.

4.2.1. Penelitian Tahun ke-1

Rancangan penelitian merupakan rancangan acak lengkap, pada tiga kelompok, yaitu maturasi oosit dengan penambahan urea masing-masing 0, 18 dan 36 mg/dl media maturasi yang disuplementasi 10% Foetal Bovine Serum (FBS), estrogen, PMSG dan hCG.

Maturasi oosit *in vitro* dilakukan sesuai dengan prosedur rutin fertilisasi *in vitro* di Sub Laboratorium Fertilisasi *in vitro*, Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (Mahaputra dkk., 1998 ; Mahaputra dan Mustofa, 2000).

Survey dan Recording Data Sapi

Pada semua sapi penelitian dilakukan pengukuran produksi susu harian (pemerahan pagi dan pemerahan sore) selama enam bulan, sambil dilakukan pencatatan siklus birahi. Pada penelitian ini tidak dilakukan intervensi penggunaan hormon reproduksi untuk gertak birahi maupun sinkronisasi birahi, karena data yang diharapkan adalah data alami tanpa perlakuan. Tanggal dan jam munculnya tanda-tanda birahi dicatat untuk memperkirakan munculnya siklus birahi berikutnya untuk pengambilan sampel susu dan darah untuk pemeriksaan.

Tanda-tanda birahi meliputi tampak mukosa vagina berwarna merah, vulva bengkak dan lebih hangat, keluar lendir jernih dari vulva, dan muncul perilaku birahi yaitu lebih sering bersuara melenguh dan menaiki sapi betina yang lain (*standing heat*). Pengamatan siklus birahi dilakukan selama dua siklus, selanjutnya pada birahi ketiga (saat birahi ditandai sebagai hari-0) dilakukan pengambilan sampel darah, diikuti pada hari-7 dan hari-22. Pengambilan darah dilakukan dengan alat suntik *disposable* 10 ml melalui vena jugularis. Darah yang diperoleh dimasukkan dalam tabung gelas tanpa antikoagulan 15 ml, dan dibiarkan terkoagulasi agar serum keluar. Koleksi sejumlah darah penuh yang sudah terkumpul selanjutnya dibawa ke Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk disentrifugasi dengan kecepatan 1.200 rpm (revolution per minute) selama 10 hingga 12 menit. Masing-masing sampel serum yang diperoleh dialokasikan kedalam tabung eppendorf ukuran 1,5 ml untuk pemeriksaan kadar estrogen, IGF-1, albumin, glukosa dan kholesterol. Peneraan kadar estrogen dan IGF-1 dilakukan dengan Elisa di Sub Laboratorium Endokrinologi, Laboratorium Kebidanan veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Peneraan kadar MUN, albumin, glukosa dan kholesterol dilakukan di Laboratorium Kesehatan daerah (Labkesda) Provinsi Jawa Timur.

Elisa Estrogen dan IGF-1

Kadar estrogen serum diukur menggunakan kit elisa buatan DRG GmbH, Germany Sedangkan kadar IGF-1 serum diukur menggunakan kit elisa buatan Fine Test, China.

Uji Maturasi Oosit in vitro

Penambahan urea (Sigma, U-5378) kedalam media maturasi in vitro dilakukan untuk mengetahui pengaruh kandungan urea (18 dan 36 mg/dl media maturasi) dalam lingkungan sekitar (microenvironment) oosit selama tahapan maturasi terhadap tingkat maturasi oosit yang diukur berdasarkan persentase kematangan oosit setelah penambahan urea. Oosit didapat dari aspirasi folikel ovarium sapi.

Penanganan ovarium sapi

Ovarium sapi dibawa dari Rumah Potong Hewan (RPH) lokal dengan temperatur diantara 27 – 35 °C. Ovarium dipisahkan dari jaringan lain dan dipilih yang terlihat sehat lalu dicuci 3 kali dengan Phosphate Buffered Saline (PBS, Bioworld, 41620016-2) hangat (39 °C) yang mengandung Gentamycin (Sigma, G-1264) 0,05 mg/ml dan terakhir direndam dalam sisa PBS sampai saat aspirasi.

Aspirasi Oosit

Cairan folikel diaspirasi dari folikel berukuran 2 – 8 mm kedalam spuit 10 ml dengan jarum 18 Gauge dan dikumpulkan dalam tabung. Spuit sebelumnya telah diisi media diseksi hangat (Lampiran 3) yang disuplementasi dengan Fetal Bovine Serum (FBS, Atlas) 10% yang telah dinaktifkan dengan pemanasan 56 °C selama 30 menit. Setelah dibiarkan selama 5 menit, cairan folikel di bagian atas tabung dibuang tanpa mengganggu endapan cumulus oocyte complex (COC) dibawahnya lalu endapan COC dipindahkan kedalam cawan petri disposibel (Nunc) 100 x 15 mm dan ditambahkan media diseksi. Selanjutnya COC dengan sitoplasma homogen, sel cumulus yang padat dengan minimal 3 lapis sel kumulus lengkap disekelilingnya dipilih dan dicuci 2 kali dengan media diseksi Pemilihan dan pencucian dilakukan dibawah mikroskop disekting (Meiji EMT dengan pembesaran 120 - 240 kali.

Maturasi Oosit In Vitro

Sebanyak 35 COC dimaturasi dengan 2 – 3 sel cumulus (ko-kultur) dalam 250 µl media maturasi (Lampiran 4) yang disuplementasi dengan FCS 10%, Pregnant Mare

Serum Gonadotropin (PMSG, Folligon - Intervet) 0,15 IU/ml dan human Chorionic Gonadotropin (hCG, Chorulon - Intervet) 0,15 IU/ml dan telah diekuilibrasi kandungan gas dan pHnya selama 2 jam dalam incubator CO₂. Drop media ditutup dengan minyak mineral (Sigma, M-8410) hangat dan steril. Ko-kultur dilakukan dalam incubator (Compact CO₂ series, Thermolyne) CO₂ 5%, 38,5 °C, kelembaban maksimal selama 24 jam. Semua prosedur dilakukan dalam laminar flow horizontal untuk mencegah kontaminasi.

Pemeriksaan Tingkat Maturasi Oosit

Setelah 20 jam maturasi, beberapa oosit diambil secara random dan dilepas sel-sel kumulusnya dengan pemipetan berulang dalam media diseksi yang mengandung Hyaluronidase 300 U/ml (Sigma, H-3884). Oosit yang telah bebas dari sel-sel kumulus ditaruh diatas slide yang telah diberi campuran paraffin wax dan vaselin (1:9, w/w) untuk mempertahankan cover glass tetap menyentuh oosit tanpa tekanan berlebihan. Selanjutnya oosit difiksasi dan dijernihkan dengan perendaman dalam aceto-methanol 1:3 (v/v) (Acetic acid glacial, Merck; Methanol, Merck) selama 24 jam dan diwarnai dengan aceto-orcein 1% (w/v) dan terakhir dicuci dengan campuran acetic acid, glycerol (Sigma, 49781) dan aquadest (1:1:3) untuk menghilangkan pewarna yang berlebihan. Penentuan status nukleus oosit dilihat dibawah mikroskop inverted (Olympus CK2) dengan pembesaran 400 x. Maturasi yang tercapai menunjukkan stadium metaphase II dimana ditemukan *plate* metaphase II dan polar body I.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

Pemeriksaan serum darah telah dilakukan untuk kadar MUN, glukosa, albumin dan kolesterol (Tabel 5.1) serta kadar estrogen dan IGF-1 serum hari-0, -7 dan 22 (Tabel 5.2 dan 5.3).

Tabel 5.1. Kadar MUN, Glukosa, Albumin, dan Kholesterol ($X \pm SEM$) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting

	MUN	Glukosa	Albumin	Kolesterol
Bunting	12,10 \pm 1,05 ^a	16,70 \pm 2,27 ^a	3,28 \pm 0,04 ^a	138,60 \pm 8,66 ^a
Tidak Bunting	19,24 \pm 1,87 ^b	23,43 \pm 3,51 ^b	3,43 \pm 0,04 ^a	193,86 \pm 9,56 ^b

Keterangan: superskrip yang tidak sama dalam satu kolom berbeda nyata ($p < 0.05$).

Tabel 5.2. Kadar Estrogen (rata-rata \pm SEM) pada Saat Birahi (D0), Hari ke-7 (D7), dan Hari ke-22 (D22) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting

Status Kebuntingan	Estrogen		
	D0	D7	D22
Bunting	84,10 \pm 3,81 ^b	49,25 \pm 2,53 ^b	43,56 \pm 2,96 ^a
Tidak Bunting	70,62 \pm 2,31 ^a	43,93 \pm 1,68 ^a	52,69 \pm 4,38 ^b

Keterangan: superskrip yang tidak sama dalam satu kolom berbeda nyata ($p < 0.05$).

Tabel 5.3. Kadar IGF-1 (rata-rata \pm SEM) pada Saat Birahi (D0), Hari ke-7 (D7), dan Hari ke-22 (D22) dalam Serum pada Sapi Perah Bunting dan Tidak Bunting

Status Kebuntingan	IGF-1		
	D0	D7	D22
Bunting	233,87 \pm 16,19 ^b	225,95 \pm 14,41 ^a	223,61 \pm 11,74 ^a
Tidak Bunting	216,91 \pm 2,62 ^a	214,54 \pm 2,31 ^a	212,26 \pm 1,50 ^a

Keterangan: superskrip yang tidak sama dalam satu kolom berbeda nyata ($p < 0.05$).

Dalam kondisi penelitian ini dari satu ovarium didapatkan rata-rata 4,7 oosit (range 2 – 6) yang terpilih sesuai kriteria.

Tabel 5.4. Tingkat Maturasi Oosit (% , rata-rata \pm SEM) Sapi secara in Vitro setelah Suplementasi Urea Urea dalam Media Maturasi

	Kontrol	Urea 1	Urea 2
Maturasi oosit (Rata-rata \pm SD)	61,0 \pm 1,53	58,9 \pm 2,73	59,2 \pm 2,23

Urea 1= 18 mg/dl; urea 2= 36 mg/dl; maturasi diperiksa dengan, dengan identifikasi *plate* metaphase II dan *polar body* I setelah pewarnaan acetoorcein 1%; ulangan= 9 kali maturasi in vitro.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Dari hasil penelitian tahun pertama, diketahui efek penambahan urea sebagai bentuk *defined media* mewakili kadar tinggi serum *in vivo* terhadap tingkat maturasi, namun efek terhadap berbagai parameter fertilisasi dan kualitas embrio belum diketahui.

Dalam penelitian tahun kedua akan dilakukan fertilisasi secara *in vitro* menggunakan semen beku sapi unggul untuk mengetahui pengaruh penambahan urea pada media maturasi oosit terhadap angka fertilisasi (pembentukan pronukleus jantan dan betina), angka *cleavage*, persentase pembentukan morula, blastosis dan kualitas blastosis serta beberapa parameter apoptosis dan nekrosis dengan teknik immunositokimia.

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

- a. Terdapat perbedaan kadar MUN, glucose dan kolesterol antara sapi perah bunting dan tidak bunting.
- b. Tidak terdapat perbedaan kadar albumin antara sapi perah bunting dan tidak bunting.
- c. Terdapat perbedaan kadar hormon estradiol antara sapi bunting dan tidak bunting, baik pada hari-0, -7 dan -22.
- d. Terdapat perbedaan kadar IGF-1 antara sapi bunting dan tidak bunting pada hari-0.
- e. Tidak terdapat perbedaan kadar IGF-1 antara sapi bunting dan tidak bunting pada hari-7 dan hari-22
- f. Tidak terdapat perbedaan tingkat maturasi oosit in vitro setelah penambahan urea 18 dan 36 mg/dl.

7.2. Saran

- a. Perlu diberikan pendanaan tahun kedua untuk menuntaskan penelitian.
- b. Waktu penelitian yang lebih panjang, misalnya 1 tahun dari keluarnya dana penelitian.
- c. Perlu dilakukan penelitian pemberian makanan berlemak terhadap produksi susu dan performans reproduksi.

REFERENSI

- Arunvipas, P. 2004. Determining relationship between Milk Urea Nitrogen, feeding management, reproduction and environmental indicator in commercial dairy herds. Departement health management. Antlantic Veterinary College.
- Biswajit, R., B. Brahhma., S. Ghsh., P.K Pankaj and G. Manda. 2011. Evaluation of Milk Urea Concentration as Useful Indicator for Dairy Herd Management : A Review. Asian J. Anim. Vet. Adv., 6 (1) 1-19
- Butler, WR; J.J Calaman; SW Beam. 1996. Plasma and Milk urea nitrogen in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. J. Animal Science.
- Elrod, RJ and Butler WR. 1993. Reduction Fertility and alteration of uterine PH in heifers fed excess ruminally degradable protein. J. Animal Science.
- Ferguson, JD., D.T Galligan, T. Blanchard, M. Reeves. 1993. Serum Urea Nitrogen and Conception rate: the useful of test. J.Dairy Science
- Guo, K., E. Russek-Cohen, M.A. Vaner and R.A. Kohn. 2004. Effect of Milk Urea Nitrogen and Other Factor on Probabilit of Conception of Dairy Cows. J. Dairy Sci., 87: 188-1885
- Habib, FK; SQ maddy; SR Stitch. 1980. Zinc induced changes in the progesterone binding properties of human endometrium. Acta Endocrinol.
- Hwang, S. Y., Mei-Ju and W.C. Peter. 000. Monitoring Nutritional atus of Diry Cows in Taiwan usin Milk Protein and Milk Urea Nitrogen. Asian-Australian ournal of AnimalScienc 13 : 1667-1673
- Jackson, R.A., J.R. Wills, N.R. Kendall, M.J Green, R.D. Murray and H. Dobson. 211. Energy Metabolites in Pre-and Post partum dairycattle as predictor of Reproductive disorders. Vet, Rec. 168-562
- Jordan, E.R., T.E.Chapman., D.W. Holtan and L.V.Swanston. 1983. Relationship of Diretary Crude Protein to Composition of Uterine Secretion and Blood in High Producing Post Partum Dairy Cows. J. Dairy Sci., 66 : 1854-1862
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2000. Pemanfaatan teknologi bayi tabung untuk mengembangkan bank embrio sapi Madura. MKH 16(3): 17-20
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2002. Kinerja serum sapi birahi dan kuda birahi sebagai suplemen media maturasi oosit pada fertilisasi *in vitro* sapi madura. JBPS 4(3):113-117.
- Mahaputra L, Hinting A, Hermadi AH, Mustofa I, Utama S, dan Srianto P, 1992. Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Bank Embrio, Sub: Fertilisasi *in vitro* pada Sapi Madura. Penelitian Hibah Bersaing II/1. Ditjendikti Depdiknas.
- Melendez, P; A Donovan, J Hernandez. 2000. Milk Urea Nitrogen and Infertolity in Florida Holstein Cows. Departement of large Animal Clinical Sciences. College of Veterinary Medicine. University of Florida, Florida.

- Mustofa I, Mahaputra L dan Utama S, 1999a. Potensi serum kuda dan sapi birahi untuk suplemen media fertilisasi *in vitro*. *MKH* 15(2): 88–93.
- Mustofa I, Mahaputra L dan Utama S, 1999b. Identifikasi kinerja serum sapi FH dan kuda birahi dalam media maturasi oosit terhadap perkembangan sigot sapi madura. *JPUA* 7(2): 42–51
- Nourozi, M., A.H. Moussavi., M. Abazari and M.R. Zadeh. 2010. Milk Urea Nitrogen and Fertilt in Dairy Farms. *J. Anim. Vet. Adv.*, 9(10) : 1519-1525
- Nourozi,M; Alireza HM; Mehran A; M. Raissian Z. 2010. Milk Urea Nitrogen and Fertility in Dairy Farm. *Journal of animal and veterinary advances*.
- Nutrient Requirements of Dairy Cattle Seventh Revised Edition, 2001. National Research Council. United States of America.
- Pryce, J.E., M.D. Royal., P.C. Garnsworthy., I.L. Mao. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science* 86 (2004) 125–135
- Rajala-Schultz, P.J., W.J.A. Saville, G.S.Frazer and T.E Wittum. 2001.Association Between Milk Urea Nitrogen and Fertility in Oho Dairy Cows.*J. Dairy Sci.*, 84 : 482-489
- Restiadi TL, 2001. Pengaruh pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) pada maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit kambing lokal. *MKH* 16(1): 25–30.
- Rhoads, ML; RO Gilbert; MC Lucy; WR Butler. 2004. Effect of urea infusion on the uterine luminal environment of dairy cows. *J. Dairy Science*.
- Roseler, D.K., J.Dferguson, C.J. Sniffen and J.Herrema. 1993. Dietary Protein Degradability Effect on Plasma and Milk Urea Nitrogen and Milk Nonprotein Nitrogen in Holstein Cows. *J.Dairy Sci.*, 76: 525-534
- Roy, Biswajit., B Brahma, S Ghosh, PK Pankaj, G Mandal. 2011. Evaluation of Milk Urea Concentration as Useful Indicator for dairy Herd Management: A Review. Departemen of livestock production and management. College of Veterinary Sciences and Animal Husbandry, Kulttula, India.
- Sartori, R., MM Guardieiro, RS Surjus, LF Melo, AB Prata, MR Ishiguro, MR Bastos, AB Nascimento. 2013. Metabolic hormones and reproductive function in cattle. Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de Sao Paulo Piracicaba, Brazil.
- Spicer, LJ; WB Tucker; GD Adams. 1990. Relationships between energy balance, Insulin Like Growth Factor-1, and Estrous Behavior during early lactation in dairy Cows.
- Sunarso dan M.Christiyanto.2009. Manajemen pakan.Departemen Ilmu Makanan Ternak. Fakultas Peternakan. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Utama S. 1997. Influence of Insulin-like Growth Factor-II on bovine embryo development. Dissertation Master of Philosophy The University of Edinburgh, UK.
- Utama S, L. Mahaputra, I. Mustofa, dan S. Mulyati. 2002. Pemanfaatan ko-kultur monolayer sel-sel kumulus dan epitel tuba Fallopii untuk meningkatkan angka maturasi oosit dan angka fertilisasi. *Media Kedokteran Hewan* Vol. 18 No.2. Agustus 2002.

Lampiran 1. Pengukuran Kadar IGF-1 Serum

Larutan SABC dan substrat TMB diekuilibrasikan pada temperatur ruang selama 30 menit. Sebelum penambahan standard, kontrol dan sampel *microplate* dicuci 2 kali. Standar 1 (50ng/ml), standard 2 (25ng/ml), standard 3 (12,5ng/ml), standard 4 (6,25ng/ml), standard 5 (3,125ng/ml), standard 6 (1,562ng/ml) dan standard 7 (0,781ng/ml) masing-masing sebanyak 100 µl dimasukkan kedalam sumuran standar. Bufer pengencer standar/sampel sebanyak 100 µl dimasukkan kedalam sumuran kontrol (zero). Sampel serum sebanyak 100 µl dimasukkan kedalam sumuran masing-masing sampel. Pengisian untuk masing-masing standard, kontrol dan sampel dilakukan dalam 2 sumuran (untuk pengukuran dalam duplikat). *Plate* ditutup dan diinkubasi pada temperatur 37 °C selama 90 menit. Penutup dibuka dan isi *plate* dibuang. Biotin-detection antibodi (100 µl) ditambahkan ke dasar masing-masing sumuran tanpa menyentuh dinding samping. *Plate* ditutup kembali dan diinkubasi pada temperatur 37°C selama 60 menit. *Plate* dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Bufer pengencer SABC (100 µl) ditambahkan kedalam masing-masing sumuran, *plate* ditutup dan diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 30 menit. *Plate* dicuci 5 kali dengan tiap kali pencucian, bufer pencuci dibiarkan dahulu tinggal dalam sumuran selama 1-2 menit. Substrat TMB sebanyak 90 µl dimasukkan kedalam tiap sumuran, *plate* ditutup dan diinkubasikan pada temperatur 37°C dalam kondisi gelap selama 15-30 menit. Larutan penghenti (stop solution) sebanyak 50 µl dimasukkan kedalam masing-masing sumuran dan dicampur rata.

O.D. absorbans dibaca dengan *microplate* reader pada 450 nm segera setelah penambahan larutan penghenti. Untuk penghitungan, O.D.450 relatif = rata-rata O.D.450 masing-masing sumuran – rata-rata O.D.450 sumuran kontrol. Kurva standard diplot sebagai O.D.450 relatif masing-masing larutan standar (Y) terhadap masing-masing konsentrasi larutan standar (X). Konsentrasi IGF-1 sampel diinterpolasi dari kurva standar.

Lampiran 2. Pengukuran Kadar Estradiol Serum

Standar, kontrol dan sampel masing-masing sebanyak 25 μ l dimasukkan dengan tip disposibel baru kedalam sumuran yang sesuai, kemudian 200 μ l Enzyme Conjugate dimasukkan kedalam masing-masing sumuran dan dicampur rata selama 10 detik. *Plate* diinkubasikan selama 120 menit pada temperature ruang (tanpa ditutup). Secara cepat isi sumuran dibuang lalu sumuran dibilas 3 kali dengan larutan pencuci (400 μ l tiap sumuran) dan *plate* dihentakkan diatas kertas hisap untuk menghilangkan butiran-butiran yang tertinggal. Larutan substrat sebanyak 100 μ l ditambahkan kedalam setiap sumuran. *Plate* diinkubasi selama 15 menit pada temperature ruang. Selanjutnya reaksi enzimatik dihentikan dengan menambahkan 50 μ l larutan penghenti (Stop Solution) kedalam setiap sumuran. Dalam 10 menit setelah penambahan larutan penghenti absorbans (OD) dari tiap sumuran ditentukan dengan microtiter plate reader pada 450 ± 10 nm.

Rata-rata nilai absorbans untuk masing-masing set standar, kontrol dan sampel dihitung. Kurva standar dibuat dengan menggunakan rata-rata absorbans terhadap konsentrasi dari setiap standar dengan nilai absorbans pada aksis vertical (Y) dan konsentrasi pada aksis horizontal (X). Konsentrasi dibaca dari kurva standar menggunakan nilai absorbans tiap sampel.

Lampiran 3. Pembuatan Media Diseksi

Komposisi dalam 1 liter

100	ml	M199 Earle's (Gibco)
75	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
7.08	g	HEPES (Sigma, H-4034)

M199, Kanamycin monosulphate dan HEPES dilarutkan dalam beaker gelas dan dibuat menjadi 900 ml dengan deionized water (Merck). pH diukur dengan pH meter (Sartorius, PB-10) dan disesuaikan menjadi pH 7,4 by dengan penambahan Sodium hydroxide (Sigma, S 2770) 1N. Selanjutnya dibuat sampai volume akhir dan dicampur sampai homogen. Osmolaritas diukur menggunakan osmometer (Cryobasic) dan disesuaikan menjadi 279 mOsm/kg H₂O. Media disterilkan dengan filtrasi menggunakan filter 0.22 µm (Millipore, Sartorius), disimpan pada temperatur 4°C dan digunakan dalam 1 bulan.

Lampiran 4. Pembuatan Media Maturasi

Komposisi dalam 500 ml:

50	ml	M199 Earle's (10X, cat. No. 21180-013, Gibco)
37.5	mg	Kanamycin monosulphate (Sigma)
2.375	g	HEPES (Sigma, H4034)
1.1	g	Sodium bicarbonate (NaHCO ₃) (Sigma, S-5761)

Semua bahan kimia dilarutkan dalam keker gelas dan dibuat menjadi 450 ml dengan deionized water (Merck). pH diukur dengan pH meter (Sartorius, PB-10) dan diatur menjadi pH 7.8 dengan penambahan Sodium hydroxide (Sigma, S-2770), kemudian dibuat sampai volume akhir. Then were made up to final volume and mixed well. Osmolarity was measured by an osmometer (Cryobasic) and was adjusted to 280 mOsm/kg H₂O. Media were sterilised by filtration through 0.22 µm filters (Millipore, Sartorius), stored at 4°C and used within 1 month.

Lampiran 5. Data Kasar Angka Maturasi

Ulangan	Kontrol	Urea 1	Urea 2
1	61.5	66.7	57.1
2	56.3	66.7	57.1
3	63.6	63.6	63.6
4	54.5	54.5	58.3
5	66.7	66.7	63.6
6	58.3	61.5	53.8
7	57.1	42.9	66.7
8	64.3	53.3	66.7
9	66.7	53.8	46.2

Lampiran 6. Statistik Penelitian

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>Kontrol</i>	<i>Urea I</i>
Mean	61.00727976	58.86187886
Variance	21.05879211	67.90116803
Observations	9	9
Pooled Variance	44.47998007	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	16	
t Stat	0.682389636	
P(T<=t) one-tail	0.252376437	
t Critical one-tail	1.745883676	
P(T<=t) two-tail	0.504752874	
t Critical two-tail	2.119905299	

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>Kontrol</i>	<i>Urea II</i>
Mean	61.00727976	59.24723425
Variance	21.05879211	44.86567132
Observations	9	9
Pooled Variance	32.96223171	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	16	
t Stat	0.650312124	
P(T<=t) one-tail	0.262359666	
t Critical one-tail	1.745883676	
P(T<=t) two-tail	0.524719332	
t Critical two-tail	2.119905299	

t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances

	<i>Urea I</i>	<i>Urea II</i>
Mean	58.86187886	59.24723425
Variance	67.90116803	44.86567132
Observations	9	9
Pooled Variance	56.38341968	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	16	
t Stat	0.108865929	
P(T<=t) one-tail	0.457331234	
t Critical one-tail	1.745883676	
P(T<=t) two-tail	0.914662468	
t Critical two-tail	2.119905299	