

**LAPORAN PENELITIAN
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2010**

TAHUN KE I



Aplikasi human Menopause Gonadotropin (hMG) Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk in vitro Fertilisasi dan Manipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium

Peneliti :

**Dr.HERRY AGOES HERMADI, MSi., drh.
Prof.Dr. WURLINA, MS., drh.
Prof. MAS'UD HARIADI, MPhil., drh., PhD.**

**DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat perjanjian pekerjaan penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 016/016/SP2H/PP/DP2**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
TAHUN 2010**



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066

E-mail : infolemlit@unair.ac.id – <http://lppm.unair.ac.id>

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN HIBAH DP2M TAHUN 2010**

1. Judul Penelitian : **Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium.**
2. Kepala Proyek Penelitian
 - a. Nama lengkap dan gelar : Herry Agoes Hermadi, drh, Msi
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. Pangkat / Golongan / NIP : IV b/ 131690437
 - d. Jabatan Sekarang : LEKTOR
 - e. Jabatan Struktural : -
 - f. Bidang Ilmu yang diteliti : Biologi Molekuler reproduksi
 - g. Fakultas / Puslit / Jurusan : Kedokteran Hewan
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 - i. Tim Peneliti

N	Nama	Bidang Ahli	Fakultas	PerguruanTinggi
1	Dr.Herry Agoes Hermadi Drh MSi	Bio Mol Reproduksi	FKH	Univ. Airlangga
2	Prof Masud Hariadi Phd Mphill Drh	Hormonal	FKH	Univ. Airlangga
3	Prof Dr Wurlina MS Drh	Kemajiran	FKH	Univ. Airlangga

3. Pendanaan dan Jangka waktu Penelitian

- a. Jangka waktu penelitian : 7 bulan
- b. Biaya yang diperlukan : Rp. 32.500.000,-
- c. Biaya yang disetujui : Rp. 32.500.000,-

Surabaya, 26 Oktober 2010

Ketua Peneliti,

Herry Agoes Hermadi, drh, Msi
Nip.131690437



Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Prof. H. Romziah Sidik, Ph.D. Drh
Nip. 130687305



Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian
Kepada Masyarakat Unair

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi
NIP. 195908051987011001

1. URAIAN UMUM

1.1. Judul Usul : *Aplikasi human Menopause Gonadotropin (hMG) Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk in vitro Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium.*

1.2. Ketua Peneliti :

- * Nama lengkap dan gelar : Dr.Herry Agoes Hermadi, MSi, drh
- * Bidang Keahlian : Reproduksi Ternak – Kemajiran
- * Jabatan : Lektor Kepala IVB
- * Unit Kerja : Fakultas Kedokteran Hewan Unair
- * Alamat Surat : Jl. Gunungsari Indah AZ-21 Surabaya
- Telepon : (031) 7661219 HP. 081 23249563

1.3. Anggota Peneliti

No	Nama dan Gelar Akademik	Bidang Keahlian Kemajiran	Instansi	Alokasi Jam/Minggu
1.	DR.Herry Agoes Hi, drh, MSi	Kemajiran	FKH Unair	10
2.	Prof DR Wurlina, drh, MS,	USG	FKH Unair	10
3.	Prof Masud Hariadi drh, M.Phill PhD.	Biomol	FKH Unair	10

KATA PENGANTAR

Puji syukur Tim Peneliti panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya kepada staf pengajar yang terlibat di dalam penelitian ini, sehingga dapat terselesaikannya penulisan laporan hasil penelitian yang berjudul : **Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita *Hypofungsi Ovarium*.** yang didanai oleh dana Hibah Bersaing Perguruan Tinggi tahun anggaran 2010.

Pada kesempatan ini, peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Menteri Pendidikan Nasional
2. Rektor Universitas Airlangga
3. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat UNAIR
4. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan UNAIR
5. Kepala bagian Reproduksi Veteriner FKH UNAIR
6. Kepala Laboratorium Biologi Molekuler Jurusan Kimia FMIPA UNBRAW
7. Seluruh mahasiswa yang terlibat dalam penelitian ini.

Kami menyadari bahwa penelitian ini masih memerlukan penyempurnaan, untuk itu diperlukan saran dan kritik.

Tim Peneliti

RINGKASAN

Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium.

**HERRY AGOES HERMADI
WURLINA
MAS'UD HARIADI**

human Menopause Gonadotropin (hMG) adalah *human FSH-LH* merupakan hormon glikoprotein yang dijumpai di dalam urin perempuan pascamenopause, sehingga disebut sebagai *FSH-LH like*. *human FSH* mempunyai berat molekul sekitar 30 kDa dan *LH* 28,5–30 kDa.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan *hMG* ekstraksi dan *hMG* terelusi dari urin perempuan pascamenopause dan mengkaji peran *hMG* terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro*. *vage* embrio sapi secara *in vitro*.

Hasil pemeriksaan sampel urin yang dipakai dari perempuan pascamenopause dengan SDS-PAGE yaitu mempunyai BM 30 kDa yang merupakan glikoprotein. Glikoprotein adalah molekul protein yang berikatan dengan molekul karbohidrat, menggunakan *Glycoprotein Carbohidrat Estimation Kit 23260*. Kadar glikoprotein, protein dan karbohidrat dari molekul *hMG* kadar glikoprotein 99860,00 ug/ml (Hibah Bersaing 2008).

Uji biologis *hMG* ekstraksi dan *hMG* terelusi terhadap kecepatan waktu terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro*. Pematangan oosit sapi yang dilakukan selama 20 jam dan 24 jam terhadap 5 perlakuan dengan 5 ulangan dan masing-masing ulangan 10 oosit sehingga total terdapat 500 oosit dengan klasifikasi sebagian besar mempunyai kumulus lengkap. Pemeriksaan tahap perkembangan kematangan sel telur adanya pronukleus betina pada sitoplasma dan polar bodi I (PBI) pada *perivitelin space* sebagai kriteria morfologi terjadinya kematangan oosit secara *in vitro* diperoleh pada kelompok kontrol, perlakuan P₁, P₂, P₃ dan P₄. Inti sel oosit cukup besar terletak pada posisi eksentrik dan mengandung dua nuklei kromatik dengan pewarnaan *Aceto orcein* 1%. Bentuk pronukleus betina tampak putih agak transparan. Perkembangan sitoplasma sangat baik dengan adanya perkembangan inti. Terjadi peregangan ikatan antar kumulus secara meluas bila dibandingkan sebelum maturasi. Polar bodi II, yang merupakan indikator telah terjadinya fertilisasi, kejadian ini

kecil, tidak semua polar bodi II dapat dilihat karena letak oosit yang berubah-ubah, sedangkan polar bodi II berada relatif tetap pada salah satu sisi oosit yang berbentuk bola.

Pengaruh interaksi antara perlakuan dan waktu untuk jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna perbedaan sangat bermakna ($p < 0,05$) dengan perlakuan kombinasi hMG ekstraksi, hMG terelusi1 – 2ug/ml dan control PMSG 5 IU-20 jam dan 24 jam

Sebagai kesimpulan pemutusan ikatan glikan pada molekul FSH-LH Like (hMG) dari urin perempuan pascamenopause dapat digunakan untuk terbentuknya *cleavage* oosit sapi secara *in vitro*.

SUMMARY

The Application of *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Isolated (hibah bersaing 2008) Toward cleavage Embryo In vitro and Manipulation of Friesian Holstain Cow Hypofunction

**HERRY AGOES HERMADI
WURLINA
MAS'UD HARIADI**

hMG is glycoprotein *human* FSH-LH extracted from urine of woman postmenopause. *hMG* consist of FSH and LH while its activities shows as FSH-LH *Like*. *human* FSH weights molecule is around 30 kDa and LH 28.5-30.0 kDa. By administration of *hMG* we expect that the *in vitro* formation of *cleavage* will be done. The duration of the of cleavage at fertilization *in vitro* process is normally 24 hours.

This research was aim to produce extracted *hMG*. elusion of *hMG* from urine of postmenopause woman and studies the role of omission of tying for the formation of cleavage cattle embryo *in vitro*.

Urine samples from postmenopause women used in the research. The methods used for analysis urine samples in the first research stage were electro elusion SDS-PAGE stress Gen Bioreagen) molecule *hMG* recognized by monoclonal antibody against *hMG*. That was band result MW 30 kDa which was glycoprotein. Glycoprotein is protein molecule that attached to carbohydrate molecule by using Glycoprotein Carbohidrat Estimation Kit 23260. The concentration rate of glycoprotein was 99860.00 µg/ml (PAS). (Hibah Bersaing 2008).

Biological test extracted *hMG*, elusion of *hMG* and PMSG 5 IU as control the time of the formation of cleavage cattle embryo *in vitro*. Maturation of cattle oocyte done during 20 hours and 24 hours from 5 restating used 500 oocytes with classification most of having complete cumulus. Inspection of developmental phase of egg cell maturity were by the existence of female pronucleus at cytoplasm and polar body I (PBI) at perivitelline space as morphology criterion the maturity of oocyte *in vitro* had already happen at group of control, treatment of P1, P2, P3 and P4. The nucleus of the oocyte was quite big, located in eccentric position and contained two chromatic nuclei with coloration of Aceto orcein 1%. Female pronucleus was seen white rather transparent. The development of cytoplasm was very good with existence of development of nucleus. Happened stretching of tying between cumulus in extends if compared to before maturation. The polar body II, which is indicated that fertilization had already happen, this incidence was small case not all polars body II visible because situation of fickle oocyte, while polar body II was located permanently at one of spherical oocyte side.

Interaction influence between treatment and time of the number ovo underwent in vitro fertilization showed non significantly difference ($p>0,05$) with treatment of combination 1 – 2 ug/ml extracted *hMG*, elusion of *hMG* and PMSG 5 IU as control group on 20 hours and 24 hours IVM.

In conclusion, disconnection of FSH-LH-like (*hMG*) from urine of postmenopause woman yielded of cleavage cattle embryo in vitro 8- 16 cells. The character of glycoprotein obtained from urine of postmenopause woman could be identified with molecular weight 30 kDa.

ABSTRACT

The Application of *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Isolated (hibah bersaing 2008) Toward Cleavage Embryo In Vitro and manipulation of Friesian Holstain Cow Hypofunction

The aims of this study was to produce *hMG* from the urine of women postmenopausal and to evaluate the influence of *hMG* extraction (as raw material) glycoprotein molecule underwent *hMG* after elution from SDS-PAGE in the onset of cleavage embryo of bovine in vitro.

Urine samples were collected from postmenopausal women *hMG* from the urine of the 30 postmenopausal women was confirmed with the 30 kDa molecular weight glycoprotein characteristic. 1- 2 ug/ml *hMG* extraction (as raw material) glycoprotein molecule underwent *hMG* after elution from SDS-PAGE *hMG* and 5 IU PMSG (pregnant Mare Serum Gonadotrophin) the onset of cleavage embryo 8 – 16 cells of bovine in vitro from 24 to 20 hours ($p < 0.05$).

Keywords: *hMG* extraction (as raw material), *hMG* after elution, embryo cleavage, in vitro

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN DEPAN	I
LEMBAR PENGESAHAN	ii
SUSUNAN PANITIA PENGUJI DISERTASI	iii
KATA PENGANTAR	iv
RINGKASAN	v
SUMMARY	vii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan umum	5
1.3.2 Tujuan khusus	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
1.4.1 Manfaat praktis	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Follicle Stimulating Hormone</i> (FSH)	6
2.2 <i>Luteinizing Hormone</i> (LH)	7
2.3 Tinjauan Kerja FSH-LH Like	8
2.4 Kebutuhan Kombinasi Hormon FSH-LH untuk Gangguan Reproduksi pada Sapi	14
2.5 <i>human</i> Menopause Gonadotropin (<i>hMG</i>) sebagai FSH-LH <i>like</i> ..	15
2.6 Aplikasi <i>hMG</i> sebagai FSH-LH <i>like</i> untuk Terapi Gangguan Keseimbangan Hormonal, IVM dan IVF	17
BAB 3. METODE PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Umum Pemecahan Masalah	21
3.2 Bahan dan Peralatan Penelitian	21
3.3 Bahan dan Peralatan Penelitian	21
3.4 Metode Penelitian	23

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Hasil Penelitian	27
4.2 Pembahasan	32
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	34
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1	Struktur molekul glikoprotein FSH	6
2.2	Perbedaan struktur FSH dan LH	7
2.3	Mekanisme Kerja FSH-Like secara seluler dan molekul (Roche, 1996)	12
2.4	Skema folikulogenis secara molekuler	13
4.1	Oosit berkumulus setelah pematangan	29
4.2	Perkembangan hasil fertilisasi in vitro 8 dan 16 sel embrio dengan pembesaran 100 x A = 8 sel, B = 16 sel	30
4.3	Perkembangan hasil fertilisasi in vitro 8 dan 16 sel embrio dengan pembesaran 200 x A = 8 sel, B = 16 sel	30

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
4.1	Hasil Uji Biologi Fertilisasi In Vitro Dimulai dari Cleavage Hingga 8-16 sel (y4%) dan Transformasi Arc.sin $\sqrt{y4\%}$ terhadap Trial Berbeda pada berbagai waktu	31
4.2	Hasil Uji Biologi perkembangan Fertilisasi In Vitro Hingga 8-16 sel (y4%) dan Transformasi Arc.sin $\sqrt{y4\%}$ terhadap Trial Berbeda pada berbagai waktu	31
4.3	Uji Anova Faktorial Hasil Uji Biologis Pemberian ekstraksi hMG, hMG terelusi dan PMSG Terbentuk Vleavage Embrio Sapi In Vitro Hingga 8-16 sel.	32

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Statistik Hasil Uji Biologis Pemberian hMG, hMGdG dan PMSG Terbentuknya Cleavage Embrio Sapi In Vitro Hingga 8 Sel dengan Uji Anava Faktorial	43
Lampiran 2. Prosedur ekstrasi urine menopause	46
Lampiran 3. Alir kerja SDS-PAGE 5% (Ratam, 2003).	47
Lampiran 4. Pembuatan Reage	48
Lampiran 5. Formula bahan kimia (washing medium)	50
Lampiran 6. Formula Bahan Kimia Media Maturasi dan Fertiisasi (Mahaputra dkk., 1999)	51
Lampiran 7. Cara kerja Pewarnaan Aceto Orcein 1%	52

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Kondisi populasi ternak sapi secara Nasional menurun 1,22% pertahun, kondisi ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti tingkat kebutuhan daging sapi yang tinggi. Kebutuhan protein asal hewan secara Nasional 6 gram/kapita/hari, namun baru tercapai 5,34 gram/kapita/hari. Disamping itu pemanfaatan teknologi inseminasi buatan, **embrio transfer** belum maksimal hasilnya dan sering terjadi gangguan reproduksi pada ternak (Ditjenak, 2006).

Salah satu gangguan reproduksi yang disebabkan oleh faktor hormonal sering terjadi pada sapi dapat mengganggu proses maturasi, fertilisasi sel telur dan produksi embrio, adalah hypofungsi ovarium. Prioritas penanggulangan gangguan keseimbangan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH), yang rendah pada hypofungsi ovarium adalah membenahi penyebab utamanya seperti, faktor manajemen, ransum pakan sapi yang cukup dengan kualitas yang baik dan seimbang, diharapkan *Body Score Condition* (BSC) telah mencapai nilai lebih dari dua, dilanjutkan dengan pemberian kombinasi FSH-LH atau FSH-LH *like*. Preparat FSH-LH *like* yang dimaksud sebagai contoh adalah *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) dan *human Menopause Gonadotrophin* (hMG) (Alcivar *et al.*, 1992; Hadley, 1992; Harjopranto, 1995; Roche, 1996).

Kebutuhan hormon *gonadotrophin* untuk tujuan terapi kemajiran dan superovulasi pada produksi embrio sapi selama ini diperuhi dari PMSG, *human Chorionic Gonadotrophin* (hCG), FSH - LH dari ekstrak *hypofisa* hewan dan FSH - LH recombinan produk bioteknologi. Penggunaan hMG untuk superovulasi pada sapi potong

pertama kali diperkenalkan oleh Alcivar *et al.* (1992) Penelitian pendahuluan dengan menggunakan hMG untuk induksi birahi dan kebuntingan pada ternak kambing pertama dilakukan di universitas airlangga menunjukkan hasil yang cukup baik (Ratnani dan hermadi, 1992). Sampai akhir tahun 1995, kebutuhan dunia akan hormon *gonadotrophin* yang berasal dari urin perempuan menopause dipenuhi dari **China, India, Eropa** dan **Amerika Latin** untuk pabrik hMG (*Menotropin*) di *USA*. Konsumen hMG pun terbatas pada kesehatan reproduksi manusia dan tidak pada hewan (Lunenfeld, 2004).

hMG yang dihasilkan dari urin perempuan menopause masih memberikan efek terapi yang baik dan relevan pada perempuan resipien atau penderita infertil, bahkan setelah terapi hMG dapat dilanjutkan langsung dalam proses *In Vitro Maturasi* (IVM) dan *In Vitro Fertilisasi* (IVF) pada manusia (Daya *et al.*, 1995; Kubo, 2005). Terapi dengan hMG menghasilkan koleksi oosit dan perkembangan embrio yang sangat memuaskan, yang hampir sama bila dibandingkan dengan menggunakan *reccombinant human* FSH (*rhFSH*). Pemberian hMG yang dilanjutkan dengan perlakuan IVF dapat memicu mitosis oosit hingga *fase metafase* (Agarwal *et al.*, 2000; Imthurn, *et al.* 1996; Mercan *et al.*, 1997). hMG efektif terhadap terapi infertilitas maupun perlakuan sebelum IVF untuk merangsang proses maturasi folikel, ovulasi dan respon ovarium, serta pertumbuhan embrio yang dihasilkan disamping harganya yang jauh lebih murah (Huang *et al.*, 2004; Koninckx, 2001; Westergaard *et al.*, 1996). Pada hewan ternak, hMG mempunyai peluang untuk dikembangkan karena sumbernya yang mudah diperoleh (Alcivar *et al.*, 1992).

Sumber hMG diperoleh saat perempuan memasuki usia 50 tahun. Diperkirakan menopause pada perempuan terjadi saat usia 50 tahun yang ditandai dengan penurunan aktivitas ovarium karena folikel primordial tidak ada lagi, sedangkan kelenjar *hypofisa anterior* tetap memproduksi FSH-LH. Pada saat itu perempuan memasuki gejala *peri* –

menopause dan berakhir pada kondisi *post – menopause*. Kondisi *menopause* menyebabkan kadar hormon *estrogen* dan *progesteron* menurun karena tidak ada proses *steroidogenesis* dan disertai dengan peningkatan kadar hormon FSH-LH. yang tinggi dalam serum darah terekspresi di dalam urin, disebut sebagai hormon kombinasi FSH-LH *Like* atau dikenal sebagai *hMG* (Mayer and Hoyer, 2005).

human FSH-LH adalah glikoprotein mempunyai struktur dan berat molekul hampir sama dengan *Bovine* FSH-LH pada sapi. Berat molekul *Bovine* FSH dan LH masing-masing adalah 30 kDa (Cheng, 1976). *hMG* adalah hormon glikoprotein yang terdiri dari gabungan dua hormon FSH dan LH, sehingga disebut sebagai FSH – LH *Like*. Human FSH mempunyai berat molekul sekitar 30 kDa dan LH 28,5 kDa. Struktur *hFSH* terdiri dari subunit α dan β . Sub unit α mempunyai 92 asam amino dan β 111 asam amino. Sub unit α dan β , masing – masing mempunyai dua ikatan karbohidrat. Dua ikatan karbohidrat ini berperan secara *in vivo* untuk mempertahankan waktu paruh (*half – life*) aktivitas biologisnya di dalam darah (Motta *et al.*, 1996; Shoham, 2007). Produksi FSH dan LH oleh *hypofisa anterior*, dipicu oleh aktivitas *Gonadotrophin hormone* (GnRh). Kedua hormon ini sebelum mencapai ovarium, terlebih dahulu mengalami **glikosilasi** di dalam darah dan selanjutnya FSH bekerja pada sel granulosa dan LH pada sel theca di folikel ovarium. Kandungan karbohidrat hormon FSH dan LH, 27,2% ada pada glikoprotein hormon ini, meliputi *N-Acetyl-d-glucoaminase (NAG)*, *alpha-d-mannosa* dengan perbandingan masing-masing adalah 1 : 1, sedangkan kadar asam sialat dan *fuco* bervariasi. *Glycoprotein* FSH terikat dari pada asam amino *aspargin* 52 dan 78, sedangkan LH pada *aspargin* 52. Komposisi *outer layer* dari glikoprotein adalah *monosacharida* asam sialat dan *inner layer* adalah *mannosa*. Komposisi karbohidrat memungkinkan glikoprotein FSH

larut dalam air karena sifat karbohidrat yang hidrofilik (Hara *et al.*, 2007; Zara and Naz, 1998).

Selaras dengan kemajuan bioteknologi dibidang peternakan di Indonesia khususnya **embrio transfer** dalam rangkah peningkatan populasi ternak sapi bank embrio di UPT Cipelang sedang digalakkan. Hormon FSH – LH sangat dibutuhkan keberadaanya untuk proses produksi embrio secara *in vitro*. hMG terdiri dari kombinasi hormon FSH dan LH. Reseptor FSH di ovarium ada pada sel granulosa yang berperan langsung pada perkembangan folikel saat maturasi oosit (Simoni *et al.*, 1997). Reseptor LH lebih banyak di sel theca ovarium, yang berperan langsung pada proses *steroidogenesis* (Khas and Menon, 1998). Maturasi sel telur di luar tubuh (IVM) tidak akan berhasil dengan sempurna apabila tidak diciptakan kondisi yang serupa dengan di dalam tubuh induknya (*In Vivo*). Maturasi oosit maupun pertumbuhan embrio secara *In Vitro* diperlukan medium yang berfungsi sebagai tempat persediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit nutrisi. Zat-zat ada dalam medium merupakan zat - zat yang terlarut contohnya gula, asam amino dan ion organik yang diperlukan untuk metabolisme sel (Mahaputra dkk., 1999). Pada proses IVM dibutuhkan pula penambahan hormon FSH dan LH. Sebelum dilakukan IVM dan IVF pada manusia, pemberian terapi hMG ataupun rFSH pada resepien menunjukkan kemampuan yang sama jika diaplikasikan hingga tingkat *Intra Cytoplasmic Injection* (ICI) (Jacob *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 1999). Pemberian FSH-LH dengan komposisi yang seimbang dalam *in vitro* fertilisasi pada ternak ruminansia memberikan hasil yang sangat baik. Dosis FSH dan LH yang diberikan, masing-masing adalah 10 µg/ml (Martino *et al.*, 1994; Goto and Iritani, 1992; Sirard and Lambert, 1985).

1.2. Rumusan Masalah Penelitian Tahap I

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut :

Apakah hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 dapat digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *invitro*

1.3. TUJUAN KHUSUS

Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut :

1.3.1. Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah. Menguji potensi biologis hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *invitro*

1.3.2. Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah : Menentukan suatu model teknologi penanganan infertilitas dan induksi birahi dengan hMG pada hewan coba lainnya dan ternak komersial pada khususnya.

1.4. Manfaat Penelitian

Mengetahui potensi biologis hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *invitro*

1.4.2 Manfaat praktis

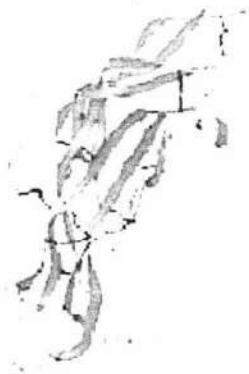
Dengan diketahuinya peran hMGdG dalam mempercepat waktu terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro* dapat dimanfaatkan untuk mengatasi kelainan reproduksi sehingga meningkatkan populasi ternak khususnya sapi melalui program pengembangan bank embrio untuk penyediaan embrio beku (*frozen embryo*) yang diperoleh dari *in vitro* maturasi dan fertilisasi. Selanjutnya dapat diaplikasikan pada embrio transfer dilapangan guna membantu meningkatkan populasi ternak khususnya sapi di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Follicle Stimulating Hormone (FSH)

FSH adalah hormon glikoprotein yang diproduksi oleh kelenjar hipofisa anterior dan memiliki berat molekul sekitar 30 kDa. Struktur morfologi FSH bersifat *heterodimer* dan terdiri dari *sub unit α* dan *β* . *Sub unit α* terdiri dari 89 asam amino yang juga dijumpai pada semua hormon *gonadotrophin*. *Sub unit β* terdiri dari 116 asam amino dan bersifat spesifik untuk FSH. Fungsi utama FSH adalah merangsang pertumbuhan folikel pada hewan betina dan spermatogenesis pada hewan jantan. FSH memicu inisiasi dan aktivasi reseptor LH pada permukaan sel granulosa. FSH juga menstimulus aktivitas *aromatase* di dalam sel granulosa sebagai *converting enzyme* saat pembentukan *estrogen* dari *androgen*. Konsentrasi FSH sangat berkorelasi dengan gelombang pertumbuhan folikel, mulai dari fase seleksi yang menseleksi folikel subordinat hingga terbentuknya folikel dominan pada akhirnya. Konsentrasi FSH juga memengaruhi aktivitas hormon lainnya seperti *estrogen*, *activin*, dan *progesteron* (Bischof and Islami, 2003; Motta *et al.*, 1996).

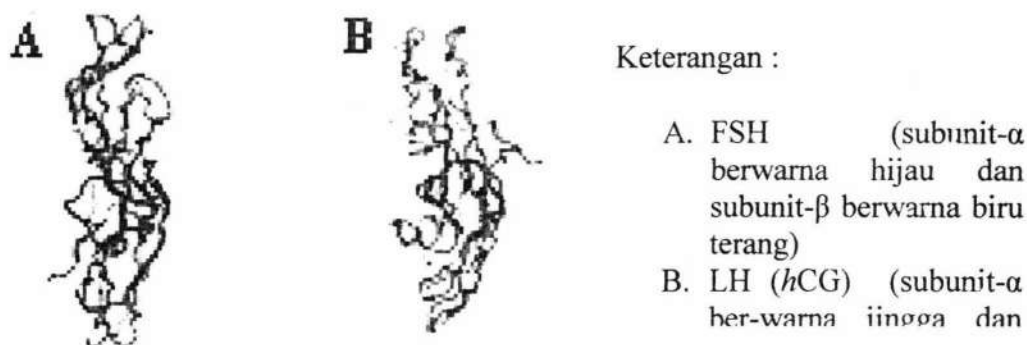


Gambar 2.1. Struktur Molekul Glikoprotein FSH
(Fox *et al.*, 2001)

2.2. Luteinizing Hormone (LH)

LH adalah hormon glikoprotein yang mempunyai berat molekul antara 28,5 hingga 30 kDa dan diproduksi oleh *hypofisa anterior*. Seperti halnya FSH, struktur LH mempunyai *sub unit α dan β* . Aktivitas utama LH adalah mengatur dan memacu produksi *androgen* dalam sel-sel techa ovarium. Fungsi yang kedua, menginduksi ovulasi dengan menstimuli aktivitas *proteolitik enzyme* yang memungkinkan dinding basmen membran folikel pecah. Fungsi ketiga, memelihara korpus luteum selama siklus menstruasi atau estrus. Konsentrasi LH dikontrol oleh beberapa hormon, yaitu GnRH, *estrogen* dan *progesteron* (Bischof and Islami, 2003; Motta *et al.*, 1996).

LH, seperti halnya FSH, termasuk *Glycoprotein Pituitary Hormone (GPH)* dan berbentuk *heterodimer*. Struktur LH dan FSH hampir sama. LH dan FSH dapat dibedakan berdasarkan bentuk spesifik *loop* pada *β -subunit*, yaitu pada *$\beta L1$, $\beta L2$, $\beta L3$* dan pada terminal *β -carboxy* (Fox *et al.*, 2001).



Gambar 2.2. Perbedaan Struktur FSH dan LH
(Fox *et al.*, 2001)

2.3. Tinjauan Kerja FSH–LH *Like*

Regulasi fungsi kelenjar *hypofisa*, khususnya *hypofisa anterior*, diawali dari sekresi GnRH oleh *hypothalamus* dan disebut *releasing factor*. *Luteinizing Releasing Hormone* (LH-RH) merupakan protein yang tersusun dari 10 asam amino (*decapeptide*) dengan berat molekul 1183 dalton. Hormon ini menginduksi pelepasan LH dan FSH dari *hypofisa anterior*. Siklus birahi diatur oleh mekanisme endokrin dan neuroendokrin yaitu hormon-hormon yang disekresi oleh *hypotalamus*, *hypofisa anterior* dan ovarium (Hafez, 2000). Hormon yang disekresi oleh *hypofisa anterior* dan terlibat pada mekanisme ini adalah FSH, LH, dan *Luteotrophic Hormone* (LTH). Hormon yang disekresi oleh ovarium adalah *estrogen* dan *progesteron*, *inhibin*, *follistatin*, serta *activin* yang semuanya memiliki fungsi khusus dalam pengendalian siklus birahi (Hadley, 1992).

Nalbandov (1990) menyatakan, faktor pelepasan (*releasing factor*) yang selanjutnya dikenal sebagai GnRH secara langsung diangkut dari *hypotalamus* ke *hypofisa anterior* melalui sistem portal. *Hypofisa anterior* akan melepaskan dua hormon *gonadotrophin* yaitu FSH dan LH. Hormon FSH berfungsi merangsang pertumbuhan dan pematangan folikel ovarium dengan cara menstimulasi proses sintesis protein dan meningkatkan aktivitas mitosis sel-sel granulosa (Dorrington, 1979). FSH berperan pada pembentukan antrum dan merangsang aktivitas sel-sel granulosa, serta pembentukan cairan folikel (Hafez, 2000). Cairan folikel mengandung *estrogen* yang meningkatkan fungsi FSH untuk merangsang sel granulosa yang pada akhirnya jumlah reseptor sel granulosa menjadi lebih banyak sehingga akan lebih peka terhadap LH. Salisbury dan VarDemark (1985) menyatakan, FSH merupakan hormon yang mengawali siklus birahi, sebab secara normal siklus birahi tidak akan terjadi sebelum folikel tumbuh dan masak. Sebaliknya sekresi FSH dihambat oleh hormon *progesteron* yang dihasilkan oleh korpus luteum, dan *estrogen* yang

banyak dijumpai dalam cairan folikuler melalui umpan balik negatif terhadap kelenjar *hypofisa anterior*. Fungsi LH pada hewan betina adalah merangsang sel granulosa dan sel theca pada folikel yang masak (**maturasi**) untuk mensintesis hormon *estrogen*, sehingga menyebabkan ovulasi dan pembentukan korpus luteum. LH bekerja sama dengan FSH menggerakkan pemasakan folikel dan pelepasan *estrogen*. Sesudah pemasakan folikel, LH memicu ovulasi dengan cara menggerakkan pemecahan dinding sel dan pelepasan ovum. Stimulasi pelepasan hormon *estrogen* dikontrol oleh hormon *gonadotrophin* yang disekresi oleh kelenjar *adenohypofisa*. Kadar FSH-LH dalam darah dikontrol oleh kadar hormon *estradiol* dan *progesteron*. Apabila kadar *estradiol* dalam darah cukup tinggi maka akan terjadi umpan balik negatif terhadap *hypofisa* dan menghambat pelepasan FSH. Menjelang ovulasi, konsentrasi *estradiol* dalam tubuh tinggi dan akan menekan produksi FSH, serta menstimulus pelepasan LH yang akan diikuti oleh terjadinya ovulasi dan saat ini memasuki fase luteal (Roche, 1996).

Lebih lanjut, Hadley (1992) menyatakan, pelepasan FSH juga dihambat oleh *inhibin* yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa ovarium melalui umpan balik negatif terhadap kelenjar *hypofisa* dan *hypotalamus*. FSH dan FSH Like adalah hormon yang berperan di dalam menumbuhkan gelombang pertumbuhan folikel mulai dari seleksi pertumbuhan folikel hingga menjadi folikel dominan yang akhirnya dapat menjadi ketergantungan terhadap LH ketika kadar FSH mulai menurun. Disinilah letak perbedaan kerja sekresi dua *gonadotropin* hormon dimana keduanya dihasilkan dalam satu sel yang sama di bawah kontrol GnRH. Sintesa *gonadotrophin* disimpan dalam granula sekretoris di dalam sitoplasma. Waktu penyimpanan LH di dalam granula sekretoris lebih lama bila dibandingkan dengan FSH (Roche, 1996).

Pada siklus gelombang pertumbuhan folikel, banyak folikel yang timbul secara simultan, namun banyak pula yang menjadi atresia selama fase luteal. Walaupun demikian, masih ada folikel yang menjadi folikel dominan. Perubahan biokimia selama perkembangan folikel subordinat menjadi folikel dominan sangat tergantung pada konsentrasi FSH-LH dan reseptor yang ada (Roche,1996).

Konsentrasi hormon FSH tidak secara langsung mempengaruhi proses folikulogenesis. Namun, saat antrum folikel terbentuk, konsentrasi FSH sangat berperan. Aktivitas sel granulosa dan theca dalam folikel dipengaruhi oleh komposisi protein-protein intrafolikuler seperti *Inhibin*, *Activin*, *Insulin Like Growth Factor Binding Protein* (IGFBP) dan *Insulin Like Growth Factor I* (IGF I), baik secara langsung maupun tidak langsung. Protein-protein tersebut dapat merangsang pertumbuhan folikel dan *steroidogenesis* lebih lanjut hingga mencapai folikel dominan (Roche, 1996).

Inhibin dalam cairan intrafolikuler memicu sintesis *androgen* yang berdampak pada terbentuknya reseptor LH dalam sel theca ovarium. Pada kondisi ini dimungkinkan terjadi mekanisme lokal *feed back* (*feed back loop*) diantara individual folikel yang terkait dengan perubahan *inhibin*, *activin*, dan ikatan protein (*binding protein*) di bawah pengaruh lingkungan sistematik *gonadotrophin* dan *Growth Hormon*. Pertumbuhan folikel dominan dan perubahan kadar *estradiol* dipengaruhi oleh kadar *inhibin*, *activin*, dan *IGF binding protein*. Dugaan ini dibuktikan dengan uji *immunoblot kuantitatif* terhadap konsentrasi IGF1, IGFBP 2 (*IGF binding protein 2*) dalam cairan intrafolikuler pada fase seleksi (hari 2-4 dari siklus estrus), fase dominasi (terbentuknya folikel dominan pada hari ke 5 siklus estrus) dan fase "*loss of dominance*" (hilangnya folikel dominan dan kembali ke fase seleksi, pada hari ke 8-12 dari siklus estrus) (Knight, 1991; Mather *et al.*, 1992; Findlay, 1993).

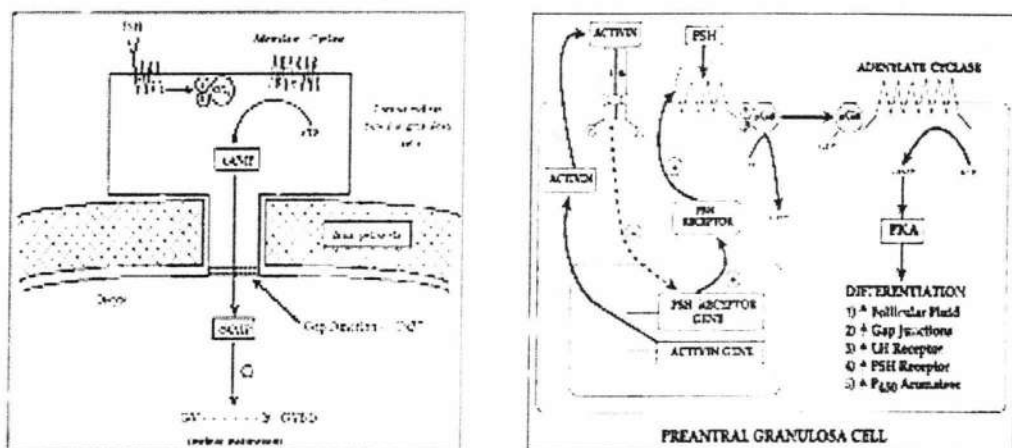
Cairan folikel dari folikel dominan berisi *aromatase inhibitor* yang tidak mempengaruhi aktivitas FSH. Protein inhibitor ini diproduksi oleh sel granulosa dan disimpan di dalam cairan folikel. Sintesa protein yang dapat ditera dengan SDS - PAGE di dalam cairan folikel hingga 90 kDa. Protein yang dimaksud adalah IGF – *Binding protein*, *inhibin*, *activin*, dan *proteoglycans*. Senyawa lain dijumpai *tissue inhibitor metalloproteinase* (TIMP), IGFBP3 dan IGFBP4 (Roche, 1996; Webb *et al.*, 2004).

Inhibin dan *estradiol* secara langsung mempengaruhi aktivitas *Hypofisa anterior*. Kedua hormon tersebut akan mereduksi proses transkripsi dan stabilitas *mRNA* yang berkaitan dengan aktivitas GnRH terhadap pelepasan FSH. *Estradiol* dan *inhibin* menyebabkan penurunan FSH (Roche, 1996).

Seleksi dominasi pada sapi terjadi selama gelombang pertumbuhan folikel. Aktivitas korpus luteum di dalam kondisi ini menghasilkan *progesterone*. Ada korelasi antara produksi *estradiol* dengan pertumbuhan folikel dan gelombang pertumbuhannya. Gelombang pertumbuhan folikel dilihat dari siklus birahi terjadi satu seleksi dimana folikel sub ordinat berkembang menjadi dominan folikel dan yang lain berubah mengalami atresia. Pada awal dan pertengahan fase luteal, folikel dominan yang tidak diovolusi akan atropi namun yang mengalami ovulasi berkembang menjadi korpus luteum. Setelah FSH berada di dalam folikel, 2-3 hari dari siklus birahi, folikel akan tumbuh. Pada hari ke 4 dan ke 5 dari siklus birahi, folikel menjadi folikel dominan dan terjadi penurunan kadar FSH. Pada folikel subordinat, hormon *estrogen* dalam keadaan inaktif karena kadar hormon *progesteron* tinggi dan kehilangan FSH reseptor. Rendahnya konsentrasi FSH menyebabkan atresia folikel. Folikel dominan, aktivitas reseptor FSH di dalam sel granulosa menurun, karena sel granulosa banyak menghasilkan *estradiol*. Akhir fase

dominan, LH menjadi dependen, dimana folikel bisa menjadi atresia atau justru terjadi ovulasi (Gordon, 1993; Ireland and Roche, 1983; Moor *et al.*, 1984; Roche, 1996).

Pada hari ke 3 siklus birahi semua folikel menghasilkan *estrogen* yang aktif dan pada hari ke 5 hanya folikel dominan saja yang berkembang. Pada kondisi ini *folikel sub ordinat* lainnya tidak akan berkembang menjadi folikel dominan. Produksi *estradiol* akan meningkat dan bersama *inhibin* menyebabkan aktivitas reseptor FSH menurun. Berat molekul *inhibin* adalah 34 kDa (Roche, 1996).

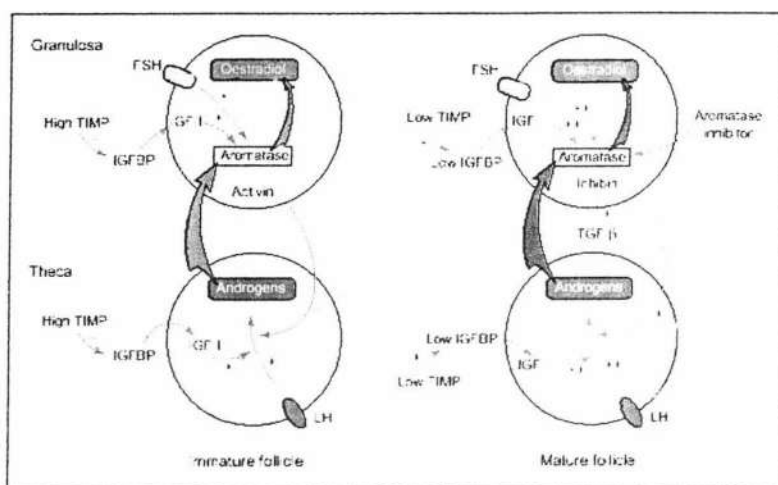


Gambar 2.3. Mekanisme Kerja FSH – Like Secara Seluler dan Molekuler (Roche, 1996)

Model interaksi antara *growth factor* di dalam cairan folikel, *steroidogenesis*, *Putative Aromatase Inhibiting Peptide (PAIP)* dan granulosa sel dari folikel *mature* dan *immature* dapat dilihat pada gambar 2.6. Pada folikel *immature* terlihat adanya konsentrasi *TIMP* dan *IGFBP* yang tinggi, serta rasio *activin* : *inhibin* rendah dalam cairan folikel. *TIMP* menghambat pembelahan proteolitik *IGF1* dari *IGFBP*. Besarnya produksi *TIMP* di dalam folikel *immature* mengakibatkan kecilnya bioavailabilitas *IGF1* sinergi dengan *LH* yang merangsang *androgen* yang diproduksi oleh sel *theca* dan dengan *FSH* untuk

menstimuli *aromatase* di dalam sel granulosa. Besarnya kadar *activin* menurunkan produksi *androgen* oleh sel theca (Hillier *et al.*, 1991; Monger *et al.*, 1993). Pada folikel yang *mature*, sebaliknya, TIMP menurunkan kadar IGFBP, IGFBP2 dan IGFBP4 (Monger *et al.*, 1993), terdapat rasio *inhibin* : *activin* besar didalam cairan folikel. Aktivitas *inhibin* pada sel theca merangsang produksi *androgen* oleh LH (Findlay, 1993). Tingginya IGF1 karena konsekuensi dari penurunan TIMP dan IGFBP juga merangsang produksi *androgen* oleh sel theca. Kadar *androgen* yang tinggi memicu *aromatisasi* pada sel granulosa. *Aromatisasi* akan berjalan sempurna bila FSH ada di dalam sel granulosa. *Androgen* di produksi dalam jumlah besar dan aktivitas *aromatase* oleh sel granula-granula berkorelasi dengan produksi *estradiol* sebagai keluaran dari folikel dominan dan setelah itu *aromatase inhibitor* terjadi setelah aktivitas sel granulosa berakhir.

Fase seleksi, penghambatan dari folikel dominan dan semua blok diterangkan tentang perubahan *estradiol* dan formasi *inhibin* terjadi secara spontan selama 3 – 5 hari. Peningkatan *activin* pada folikel sub ordinat tidak diblokir. FSH berperan dalam mekanisme *inhibin* dimana terjadi penurunan kadar setelah hari ke 1 proses pertumbuhan folikel dan terjadi penurunan pula pada kadar FSH dalam serum darah. Setelah hari ke 5 terjadi kehilangan faktor dominasi, *estrogen* aktif menjadi *estrogen* inaktif.



Gambar 2.4.. Skema Folikulogenesis Secara Molekuler (Roche, 1996)

Pada hari ke 5-8 siklus birahi, folikel dominan kehilangan aktivitas FSH-LH *receptor* karena ada peningkatan produksi *estradiol* dan *inhibin precursor (Ip)*, *activin* dan *IGFBP2*. Pemberian *progesterone* dan *prostaglandin* dengan dosis rendah dapat digunakan untuk meningkatkan *LH pulsative* jika pada gelombang pertumbuhan folikel yang pertama kadar *estradiol*, *inhibin*, *IGFBP2* tidak menurun (Roche, 1996).

2.4. Kebutuhan Kombinasi Hormon FSH-LH untuk Gangguan Reproduksi pada Sapi

Gangguan reproduksi merupakan salah satu aspek utama yang mengganggu pengembangan peternakan sapi di Indonesia. Beberapa teknologi mutakhir yang telah diciptakan digunakan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak dan mengatasi gangguan reproduksi. Teknologi yang dimaksud adalah induksi birahi, penanganan kasus infertilitas, inseminasi buatan, super ovulasi dan embrio transfer. Dampak gangguan reproduksi yang nyata adalah populasi sapi dan produksi susunya yang rendah. Gangguan reproduksi pada sapi yang paling sering terjadi adalah hypofungsi ovarium karena kesalahan manajemen pakan (Hardjopranjoto, 1995).

Hypofungsi ovarium merupakan kondisi patologik karena gangguan sekresi hormon FSH-LH, sehingga konsentrasi FSH-LH tidak seimbang. Gangguan keseimbangan FSH-LH terjadi karena kesalahan manajemen pakan, stres lingkungan dan defisiensi hormon. Semua kondisi negatif ini menyebabkan terganggunya poros *hypothalamus - hypofisa - ovarium* dan berdampak pada penurunan sekresi GnRh oleh hipotalamus dan diikuti menurunnya hormon *gonadotrophin* FSH-LH serta mengakibatkan tidak tumbuhnya folikel pada ovarium (Harjopranjoto, 1995). Sapi yang menderita hypofungsi ovarium menunjukkan gejala *anestrus* dalam jangka waktu lama. Ukuran ovarium normal namun

permukaannya licin, karena tidak terjadi pertumbuhan folikel (Arthur, 1993). Untuk menanggulangi gangguan reproduksi karena hypofungsi ovarium diperlukan perbaikan faktor manajemen penyebabnya disamping pemberian preparat hormonal FSH-LH *Like*. Bila keadaannya sudah menjadi lebih baik dapat disusul dengan penyuntikan preparat kombinasi FSH-LH atau FSH-LH *like* seperti, PMSG dan hMG (Alcivar *et al.*, 1992; Hadley, 1992; Harjopranto, 1995; Roche, 1996).

2.5. *human Menopause Gonadotropin (hMG) Sebagai FSH-LH Like.*

hMG sebagai **FSH-LH Like** pertama kali diproduksi yang dikemas dalam bentuk hormon injeksi 150 IU untuk kepentingan kesehatan reproduksi manusia. Komponen penting yang paling menunjang dari *hMG* adalah kandungan FSH-LH yang seimbang, yaitu dikenal dengan istilah komposisi FSH : LH 50% : 50%. Kondisi demikian sangat menguntungkan, mengingat pemberian FSH-LH yang tidak seimbang komposisinya dapat berdampak pada terjadinya sistik ovari atau sistik folikel. Terjadinya sistik ovari atau sistik folikel sebagai dampak pemberian preparat kombinasi FSH-LH yang tidak seimbang contohnya PMSG mengandung FSH : LH 75% : 25%. Sangatlah kecil terjadinya sistik ovari pada pemberian preparat kombinasi LH – FSH yang seimbang (Giudice *et al.*, 1994; Harjopranto, 1995; Westergaard, 1999). Preparat kombinasi FSH-LH, pertama kali digunakan untuk terapi gangguan reproduksi pada sapi adalah PMSG. Namun, pemberian preparat PMSG dapat dapat berdampak timbulnya antibodi PMSG (anti PMSG). Anti PMSG yang terbentuk menyebabkan dosis injeksi yang diberikan lebih besar saat penyuntikan yang ke dua, oleh sebab itu perlu dicarikan alternatif pengganti hormon PMSG, diantaranya adalah *hMG* (Harjopranto, 1995).

Pada kondisi *menopause* terjadi peningkatan kadar FSH-LH dalam darah dan hormon FSH-LH dalam urin disebut *hMG*. Di sisi lain, kadar *androstendion, testosteron, dan IGF* menurun, serta fase folikuler yang diperpendek (Francis and Phyllis, 2003). Perempuan menopause memperlihatkan tanda-tanda tidak menstruasi yang permanen, serta kadar FSH-LH dalam darah dan urin tinggi. *hMG* mempunyai aktivitas yang menyerupai dengan FSH-LH, sehingga dapat disebut sebagai *FSH-LH like*. *hMG* ditemukan oleh Donini dan Montezelo pada tahun 1949 yang selanjutnya dipasarkan oleh *Serono* dengan merk dagang *Pergonal*. *hMG* mengandung hormon FSH dan LH dengan perbandingan 1 : 1. *hMG* merupakan hormon *Gonadotrophin* yang terdapat di dalam urin perempuan yang telah mengalami menopause. Kandungan FSH dan LH (ICSH) dalam *hMG* telah diketahui, . Kandungan FSH-LH dalam *hMG* dan aktivitas biologisnya dijabarkan oleh *Second International References Preparation for human Menopausal Gonadotrophin* yang pertama kali dibahas pada tahun 1964 oleh *expert committed on biological standards of WHO* (Anonimus, 1994). Urin pada perempuan menopause sebagai sumber *hMG* (*FSH-LH Like*). Kapan seorang perempuan akan memasuki masa menopause? masa ini sulit diduga datangnya, tapi kini para ahli di berbagai negara telah mengembangkan metode untuk memprediksi kapan menopause akan tiba. Prediksi dilakukan berdasarkan ukuran ovarium seorang perempuan atau berapa banyak sel telur yang masih tersisa dengan menggunakan *ultrasonografi* (USG). Perempuan dilahirkan dengan total telur sekitar 800.000 buah dan jumlah ini akan berkurang sejalan dengan bertambahnya usia. Pada saat usia mencapai ± 37 tahun, sel telur yang masih tersisa sekitar 25.000 buah, selanjutnya terjadi penurunan sel telur yang semakin cepat dan ovarium akan terus menyusut hingga seluruh telur habis dan masa menopause tiba. Perempuan biasanya mencapai masa menopause pada usia 50 tahun, dengan toleransi waktu 7 atau 8 tahun. Seorang perempuan:

yang mengalami menopause memperlihatkan penurunan konsentrasi hormon *estrogen* yang signifikan. Menopause pada perempuan dibedakan menjadi dua, yaitu *peri – menopause* dan *post – menopause*. *Peri – menopause* merupakan fase transisi yang ditandai oleh munculnya kondisi “*hot flushes*” yang terjadi karena gangguan fungsi *thermoregulator*. Gejala klinis lain yang muncul adalah pengeroposan tulang, kekeringan vagina, penurunan fungsi *cardiovascular*, *hypoestrogenic* dan hilangnya siklus menstruasi. Sering kali datangnya menopause dikaitkan dengan proses penuaan (Francis and Phyllis, 2003).

Pada 1993 *Metrodin-HP* (FSH *highly purified*) diperkenalkan. Sediaan ini hampir tidak mengandung LH. *Metrodin-HP* jauh lebih baik dari *Metrodin* dan *Pergonal* karena sudah lebih murni (FSH > 95%) dan protein urin jumlahnya sangat sedikit (< 5%). Permintaan FSH meningkat terus pada awal 1997. FSH dapat dibuat dengan rekayasa genetika, disebut sebagai FSH *recombinant* (rFSH). *Serono* memasarkan FSH *recombinant* tersebut dengan nama dagang *Gonal-F*. *Gonal-F* telah disahkan oleh *European Medicines Evaluation Agency* (EMEA) dan FDA. FSH *rekombinan* oleh sel *China Hamster Ovary* (CHO) melalui teknologi DNA diproduksi *Rekombinan* yang terdiri dari *sub unit α* (disusun oleh 92 asam amino) dan *sub unit β* (disusun oleh 111 asam amino) (Silitonga, 2006).

2.6. Aplikasi hMG Sebagai FSH–LH Like untuk Terapi Gangguan Keseimbangan Hormonal, IVM dan IVF.

Penggunaan beberapa preparat hormonal sebagai kombinasi FSH-LH *Like* seperti PMSG dan hMG untuk tujuan perbaikan reproduksi belum banyak dilakukan di perternakan sapi. Salah satu tujuan pemberian PMSG dan hMG adalah induksi birahi, penanganan

infertilitas karena hypofungsi ovarium. PMSG merupakan hormon *gonadotrophin* dengan berat molekul antara 28.000 - 30.000 dalton. Struktur PMSG sama dengan hormon gonadotrophin pada umumnya, yaitu struktur *sub unit* α dan β . PMSG tersusun dari glikoprotein dengan kandungan karbohidrat sebesar 40% dan asam sialat sebesar 10,4%. Adanya kandungan asam sialat yang tinggi dapat memperpanjang waktu paruh PMSG dalam plasma darah sehingga mempunyai daya kerja yang lebih kuat. Asam sialat pun berfungsi untuk melindungi PMSG dari degradasi yang dilakukan oleh sel-sel hati (Hafez, 2000). Sulitnya memperoleh preparat FSH menyebabkan hormon PMSG merupakan alternatif untuk teknik superovulasi dan terapi hypofungsi ovarium (Ismudiono, 1999). Madyawati dkk (1994) dalam penelitiannya menggunakan PMSG pada sapi perah untuk induksi birahi dan terjadi kebuntingan. Srianto (1995), melaporkan kebuntingan kembar pada sapi perah dapat diinduksi dengan menggunakan hormon PMSG dosis rendah dan terjadi perubahan hormon *steroid* di dalam darah. Mustofa dkk. (1999), menyebutkan bahwa pemberian PMSG dengan berbagai variasi dosis akan menyebabkan terjadinya perubahan kadar hormon *estrogen* dalam darah. PMSG sangat potensial dalam menstimulasi fungsi ovarium, namun mempunyai waktu paruh yang panjang sehingga memungkinkan menginduksi perubahan folikel dan sering terjadi efek samping dalam bentuk sistik folikel .

Alcivar *et al.* (1992); Critser *et al.* (1982); Gonzalez *et al.* (1990), melakukan aplikasi hMG pada sapi dan mengamati perubahan hormon-hormon endokrin pada sapi potong betina yang disuperovulasikan dan dibandingkan dengan FSH-*p* (*porcine Follicle Stimulating Hormone*). Hasil perbandingan itu memperlihatkan efek hMG jauh lebih baik dari pada FSH-*p* bila ditinjau dari kadar hormon E2 17B (*estrogen*). Ratnani dan Hermadi (1992), telah melakukan penelitian pendahuluan untuk mengkaji pengaruh injeksi hMG

dengan birahi dan kebuntingan pada kambing. Hasil penelitian memperlihatkan hasil yang cukup memuaskan bila dibandingkan dengan kontrol. Pada sapi, estrus akan terlihat 46 ± 2 jam setelah pemberian hMG. Pengukuran terhadap kadar hormon-hormon *gonadotrophin* memperlihatkan kadar FSH, LH dan *Estrogen* darah, masing-masing adalah $45 \pm 1 \mu\text{g/ml}$, $42 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ dan $40 \pm 2 \text{pg/ml}$ (Alcivar *et al.*, 1984a; Alcivar *et al.*, 1984b; Alcivar *et al.*, 1992). Sugano *et al.* (2001), melakukan super ovulasi pada sapi *Japanese Black cattle* dengan hMG dan FSHp dari hasil penelitian ini direkomendasikan untuk menggunakan hMG pada tindakan super ovulasi. Lebih detail lagi Suzuki *et al.* (2003), melakukan optimalisasi dengan keberhasilan tinggi menggunakan hMG untuk tujuan super ovulasi pada *guinea pigs*, perkembangan dan pertumbuhan gelombang folikel serta identifikasi reseptor FSH yang homolog.

Sangat mudah melakukan ekstraksi urin dari perempuan menopause, walaupun dilakukan secara bertahap (Giudice *et al.*, 1994). Saat pertama ujicoba hMG dijumpai alergi lokal yang ringan dan kejadian ini tidak selalu konsisten (Rogers *et al.*, 1995). Efek yang terpenting diketahui adalah terjadi peningkatan konsentrasi *estradiol* yang di produksi oleh sel granulosa setelah pemberian hMG secara *in Vitro*. Peningkatan kadar *estradiol* sebagai akibat pemberian hMG tidak drastis, sehingga terbentuknya sistik ovary jarang terjadi (Teissier *et al.*, 1999).

hMG, walaupun dihasilkan dari urin perempuan menopause, tetapi masih memberikan efek terapi pada perempuan reseptor atau penderita, bahkan hMG dapat dilibatkan langsung dalam proses IVF (*In Vitro* Fertilisasi) pada manusia (Daya *et al.*, 1995). Jumlah oosit yang dikoleksi dan perkembangan embrio perempuan penderita infertilitas lebih baik bila di terapi dengan hMG dibandingkan dengan *recombinant human* FSH (Hung *et al.*, 2000). Penggunaan pada pasien yang di terapi dengan hMG, 85%

oositnya mencapai fase *metafase* saat perlakuan IVF (Agarwal *et al.*, 2000; Imthurn *et al.*, 1996; Mercan *et al.*, 1997).

Pembandingan efektivitas FSH dengan hMG dilakukan pula hingga tingkat *intracytoplasmic sperm injection* setelah pemberian keduanya secara terpisah menunjukkan hasil yang baik (Jacob *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 1999). Cara pemberian hMG diberikan secara berurutan selama 5 hari dan dikombinasikan dengan injeksi PGf2 α . Selanjutnya dilakukan inseminasi buatan tiga kali berturut-turut dengan interval 12 jam (Alcivar *et al.*, 1992; Lauria *et al.*, 1982a; Lauria *et al.*, 1982b).

Molekul karbohidrat menambah besarnya molekul glikoprotein hormon, dengan bertambahnya jumlah *glicosaminoglican*. Kompleks molekul yang merupakan ikatan antara karbohidrat dan protein ini mempunyai peran penting dalam aktivitas hormon (Aulani'am, 2003).

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Kerangka Umum Pemecahan Masalah

Pemecahan masalah dalam penelitian ini dibuat kerangka umum yang nantinya akan dijabarkan kedalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini dilakukan secara bertahap adalah sebagai berikut :

3.2. Bahan dan Peralatan Penelitian

Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian ini adalah isolat hMG yang diperoleh dari hasil ekstraksi urin perempuan menopause dan melalui karakterisasi dan isolasi dengan teknik SDS-PAGE dan Elusi. *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7, PMSF, etanol absolut, buffer Tris-HCL, NaN₃(Sodium Azide), TCM (Tissue Culture Medium) Sedangkan peralatan yang digunakan adalah microplate, , vacuum pump, vortex, gunting, pipet eppendorf, pipet Pasteur, plastik tip, cawan petri, gunting, kantong selofan, sentrifus, tabung reaksi, magnetic stirrer, incubator CO₂, refrigerated centrifuge, freezer, autoclaf, peralatan gelas, peralatan seksi, vacutainer.

3.3. Bahan dan Peralatan Penelitian

Alat-Alat Untuk *in vitro* Maturasi dan Fertilisasi pada penelitian I

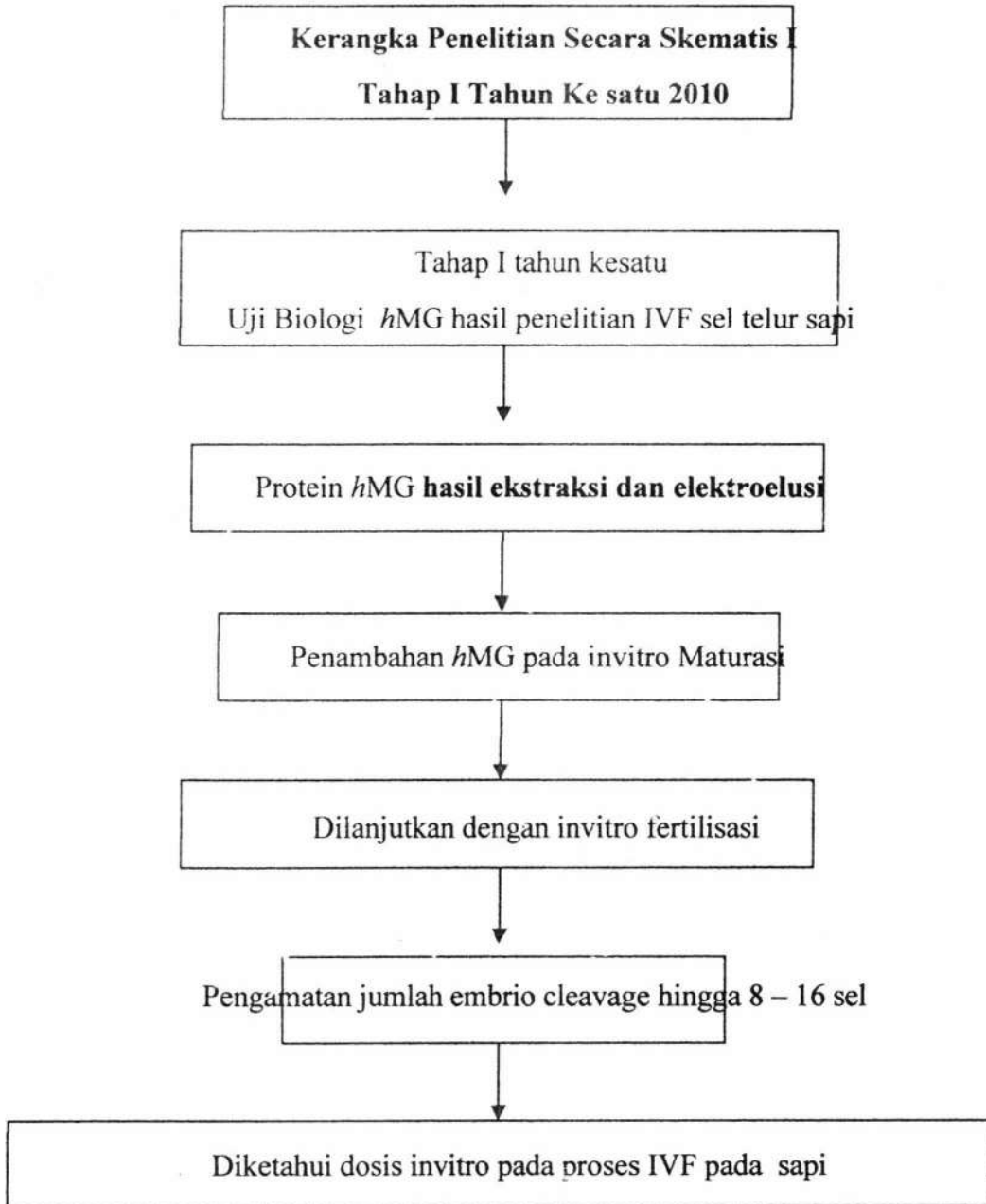
Inkubator CO₂ (*Carbon Dioxide Incubator*), mikroskop dengan jenis *Dissection Microscope* untuk koleksi dan evaluasi oosit, *inverted Microscope* untuk pemeriksaan oosit secara rinci, penangas air, untuk menghangatkan media dan untuk aktivasi serum. *Refrigrator* untuk menyimpan media dan persediaan bahan kimia timbangan (*Analytical Balance*) untuk preparasi media.

Fasilitas sterilisasi (kering dan basah) *Heating Blocks*, Cawan petri, pipet dan peralatan aspirasi folikel seperti alat suntik plastik yang berukuran 1, 5, atau 10 ml dengan jarum berukuran 18 *gauge* dan termos. *Milipore filter* dengan diameter 0,22 um Mikropipet yang terdiri dari pipet pemegang dan pipet pengisap Cawan pembiakan (*cultur dish*) dengan ukuran 35 mm. Bilik Steril.

Bahan ovarium yang akan diaspirasi folikel yang berisi sel ovum sapi diambil dari rumah potong hewan.

3.4. Metode Penelitian

Digambarkan dalam kerangka penelitian secara skematis Elisa reader adalah sebagai berikut :



3.5.1. Metode Penelitian

3.5.1.1 Pembuatan hMG

hMG dan urine wanita post menopause ditampung 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit. Selanjutnya urine kemudian dilakukan pengadukan dengan mini mixer pada suhu 4 °C selama 12 jam (Hermadi, 2001).

Diambil 200 µl sampel urin ditambah PBST-PMSF 5x volume sampel urin hingga homogen Dimasukkan ke dalam *microtube* Disonifikasi 10 menit *Divortex* Disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit diperoleh supernatant Ditambah *etanol absolut* dingin 1 : 1 Diinkubasi dalam *refrigerator* selama 1 jam atau semalam Disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit hingga diperoleh endapan Dikeringanginkan hingga bau *etanol* hilang Ditambah *buffer tris* Cl 20 mM di peroleh pteoin urine hMG melekat pada dasar tabung disebut ***urin hMG hasil ekstraksi sebagai bahan penelitian invitro.***

Sebagian dari bahan hasil ekstraksi hMG diperiksa lanjutan dengan SDS-PAGE dan elektroelusi.

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong nilon. Selanjutnya dimasukkan dalam block glass yang mengandung PBS, setelah itu di stirer selama 24 jam. Setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan pewarnaan silver, bila tidak terdapat pita artinya protein sudah ter-elusi. ***hMG hasil elusi sebagai bahan penelitian invitro.***

3.5.1.2. Uji Biologis Maturasi dan Fertilisasi Oosit Sapi *In Vitro.*

Pengisapan (*Aspirasi*) Oosit

Setelah ovarium dari rumah potong hewan dicuci 2 - 3 kali dengan larutan garam fisiologis dan ditempatkan dalam gelas beker diatas penangas air dengan suhu 37° C, selanjutnya ovarium diambil satu persatu menggunakan pinset steril dan permukaannya dikeringkan dengan kertas tissue steril. Dengan menggunakan *syringe disposable* steril ukuran 10 ml dan jarum suntik ukuran 18 G diisi dengan 1 - 1,5 ml media OWS (*Oocyt Washing Medium*). Pengisapan dilakukan dengan menusuk bagian parenkim ovarium dekat pada gelembung folikel selanjutnya ujung jarum diarahkan pada folikel-folikel yang berdiameter kurang lebih 5 mm yang berada dekat titik tusuk jarum (tanpa mencabut jarum

terlebih dahulu). Setelah seluruh cairan folikel terhisap atau apabila alat suntik telah berisi 3 - 4 ml cairan folikel, jarum dicabut dan cairan folikel dimasukkan dalam tabung reaksi dengan hati-hati untuk menghindari kerusakan mekanis pada oositnya dan disimpan dalam penangas air. Selanjutnya ditunggu sampai oosit turun ke dasar tabung, kemudian endapan dievaluasi dengan Menempatkan pada cawan petri berukuran besar dan diperiksa dibawah mikroskop stereo (Mahaputra dkk.,1999).

Koleksi Oosit

Untuk mengamati oosit, maka cairan folikel hasil pengisapan dituangkan ke dalam cawan petri dan diperiksa dibawah mikroskop stereo dan apabila telah ditemukan oosit, selanjutnya oosit diambil dengan pipet pastur modifikasi yang berdiameter sama dengan oosit, dan diletakkan pada cawan petri yang lain yang berukuran lebih kecil yang berisi media pencuci. Selanjutnya oosit diperiksa lagi di bawah mikroskop untuk ditentukan kualitasnya (Mahaputra dkk., 1999).

Uji Biologis hMG terhadap kecepatan waktu terbentuknya *cleavage* oosit sapi secara *in vitro*

Setelah diadakan penentuan kualitas oosit semua oosit terlebih dahulu dicuci dalam medium pencuci sebanyak 3 - 4 kali dan pencucian terakhir dengan *Tissue Culture Medium 199* (TCM 199) sebanyak 2,5 - 3,0 ml. Kemudian oosit yang tidak terdapat kumulus debris dipindah ke dalam medium pematangan dalam bentuk tetes (*drop*) masing - masing 100 μ l.dalam cawan petri masing - masing 20 oosit Total oosit yang digunakan dalam penelitian ini 100 oosit yang telah disiapkan 2 jam sebelumnya dalam inkubator CO₂ 5%. Masing-masing medium terdiri dari :

- P1 = Pemberian hMG hasil ekstraksi urine dosis I 1 μ g/ml secara *in vitro*
- P2 = Pemberian hMG hasil ekstraksi urine dosis I 2 μ g/ml secara *in vitro*
- P3 = Pemberian hMG hasil elusi dosis II 1 μ g/ml secara *in vitro*
- P4 = Pemberian hMG hasil elusi dosis II 2 μ g/ml secara *in vitro*
- K = Kelompok kontrol, tidak diberi hMG tetapi PMSG 5 IU

Medium-medium pematangan dibuat dalam cawan petri yang steril ukuran 35 mm dalam bentuk tetes sebanyak 4 tetes, yang masing-masing tetes volumenya 100 μ l. Dalam tiap tetes medium dapat dibiakkan sebanyak 5 oosit dan selanjutnya ditutup dengan minyak mineral. Pemiakan dengan ketiga medium dilakukan dalam inkubator yang mengandung

5% CO₂ dengan kelembaban 95 - 100 % dan suhu 39° C Masing-masing media yang diinkubasi dilakukan selama 24 jam (Mahaputra, 2007). Tahap selanjutnya adalah *In Vitro Insemination* (IVI). Dua jam sebelum inseminasi 2 *straw* mini yang mengandung 10-15 juta/ sel mani hidup dilakukan *thawing* selama 1 menit di dalam air hangat 37°C. Di lain tempat sudah disediakan 3 ml EBSS (*Earle'Balance Salt Solution* PH 7,4) di dalam vial plastik berbentuk kerucut volume 11 ml. Seluruh isi *straw* ditumpahkan di atas permukaan media EBSS lalu disentrifus 1800g selama 10 menit, lalu filtrat dibuang hingga tinggal pelet. Tindakan ini diulang 2 kali sehingga pellet terakhir setelah ditambahkan EBSS spermatozoa yang mati dapat berenang ke atas ke permukaan media EBSS (*swim up*) dalam waktu 30 menit, sehingga spermatozoa yang kurang baik motilitasnya atau mati tetap berada di dasar vial atau maximum dipertengahan media dalam vial. Dengan demikian untuk mendapatkan spermatozoa motil dan tidak ada kontaminan debris maka spermatozoa diambil dari permukaan media. Bersamaan itu pula pada tempat cawan petri lain sudah disiapkan "*Rosett Like Patern*" dibuat dari media EBSS yang ditempatkan pada bagian senter sebanyak 100 µl dan dikelilingi dengan ± 15 µl media EBSS dalam 6 drop mengelilingi sekitarnya. Masing – masing drop selanjutnya dihubungkan dari senter ketepi sehingga merupakan bentukan roset. Di masing – masing ujung roset dimaukan 10 oosit yang sudah diinkubasi selama 24 jam dalam proses maturasi. Sedangkan spermatozoa yang sedang mengalami waktu kapasitasasi melalui proses *thawing*, pencucian dan *swim up* ditempatkan sebanyak 30 µl yang mengandung total 1,25 – 1,5 X 10⁶ spermatozoa motil disentral media. Dengan demikian spermatozoa motil akan terseleksi mencari jalan masuk ke dalam ujung roset yang ada oositnya. Setelah waktu dibedakan 20,24 dan 26 jam saat fertilisasi di dalam inkubator 5% CO₂ suhu 38,5°C, maka oosit yang telah dibuahi dicuci dengan TCM 199, lalu dipindahkan kembali ke dalam drop maturasi diikuti perkembangannya hingga selama 24 jam berikutnya. Dengan demikian setelah 24 jam fertilisasi, observasi *cleavage* dilakukan dengan melihat jumlah *blastomer* di dalam embrio (Mahaputra, 2007).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. HASIL PENELITIAN

Uji Biologis hMG terhadap Terbentuknya Cleavage Embrio Sapi secara *In Vitro*

Telah dilakukan ekstraksi hMG dari urine wanita post menopause ditampung sebanyak 100 ml dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit dengan suhu 4C. Sentrifugasi ini bertujuan untuk memisahkan sel sel metabolit. Selanjutnya 200ul urine ditambahkan PBST-PMSF 5x volume sampel urin hingga homogen Dimasukkan ke dalam *microtube* Disonifikasi 10 menit *Divortex* Disentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit diperoleh supernatant Ditambah *etanol absolut* dingin 1 : 1 Diinkubasi dalam *refrigerator* selama 1 jam atau semalam Disentrifugasi 10.000 rpm selama 15 menit hingga diperoleh endapan Dikeringanginkan hingga bau *etanol* hilang Ditambah *buffer tris* Cl 20 mM di peroleh pteoin urine hMG melekat pada dasar tabung disebut ***urin hMG hasil ekstraksi sebagai bahan penelitian invitro.***

Sebagian dari bahan hasil ekstraksi hMG diperiksa lanjutan dengan SDS-PAGE dan diperoleh hasil ***hMG elektroelusi.***

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong nilon. Selanjutnya dimasukkan dalam block glass yang mengandung PBS, setelah itu di stirer selama 24 jam. Setiap 6 jam dilakukan penggantian PBS. Untuk mengetahui bahwa protein sudah mengalami elusi maka potongan gel diwarnai dengan pewarnaan silver, bila tidak terdapat Hasil penelitian ekstraksi urine yang mengandung protein hMG. Hasil peneraan selanjutnya dengan metode Biuret untuk penentuan kadar glikoprotein hMG diperoleh 99860 ug/ml.

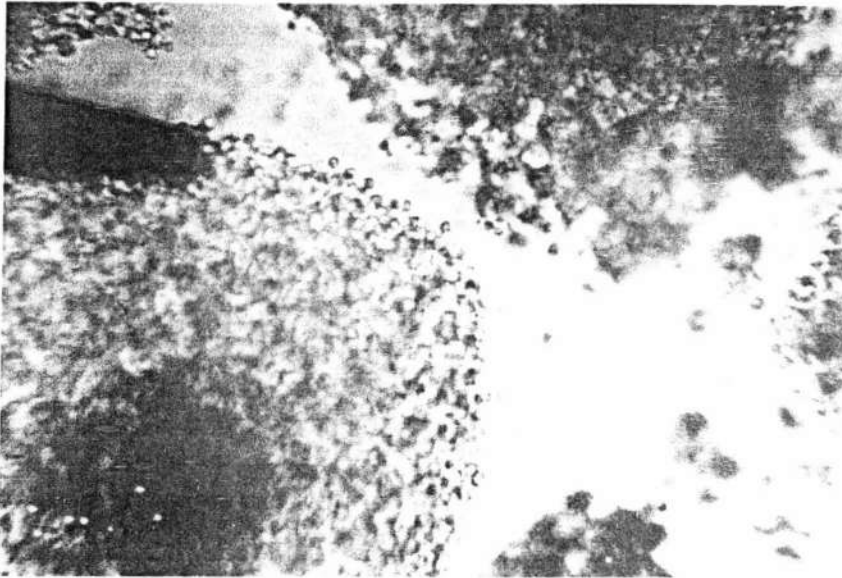
Pematangan oosit sapi yang dilakukan selama 20 jam dan 24 jam dari 5 ulangan memakai total oosit 500 buah dengan klasifikasi sebagian besar mempunyai kumulus lengkap. Kondisi tanpa kumulus (*demuded oocyte*) pada penelitian ini tidak digunakan.

Pematangan oosit ekstra folikuler atau *in vitro* pada penelitian ini dapat dievaluasi secara visual ekstra cepat dengan mengambil satu oosit dalam setiap perlakuan dan kontrol

dengan beberapa kriteria morfologi secara kualitatif. Penilaian maturasi morfologis pada beberapa sampel oosit immature dari semua plate *in vitro* sebelum dimaturasi nampak sel kumulus kompak dan lengkap dan termasuk fase 1 di mana kompleks kumulus ooporus-korona radiata yang kompak dan oosit tidak jelas seperti pada Oosit tanpa sel kumulus (*denuded oocyte*) pada penelitian ini tidak digunakan. Oosit matang secara morfologis terbagi menjadi dua fase yang merupakan kelanjutan proses maturasi yaitu fase 4 dan fase 5. Fase 4 yang dimaksud terbentuk kompleks korona radiata-kumulus ooporus longgar sedikit berlendir. Oosit tampak lebih jelas tetapi belum memiliki benda kutub I pada Gambar 4.1.. Fase 5 yang dimaksud adalah kompleks dengan korona radiata-kumulus ooporus yang longgar, cukup berlendir oosit tampak jelas dan memiliki pronucleus betina dan benda kutub I (metafase II) seperti . Kondisi oosit pasca matang (*post mature oocyte*) korona mulai lepas, sedikit kumulus ooporus yang berlendir atau sama sekali tanpa kumulus dan oosit memiliki benda kutub I. Pada sel telur yang tidak mature tidak terjadi perkembangan pada sitoplasmanya dimana korona radiatanya bervariasi, kumulus lepas atau sama sekali tanpa kumulus dan oosit mengalami degenerasi atau disebut sebagai *degenerated oocyte* dari klasifikasi tersebut, maka sel telur yang baik untuk harapan dapat dibuahi adalah yang berkumulus lengkap dan kumulus sebagian.

Pembesaran 400 X, menunjukkan oosit matang (*mature*) Hasil penelitian yang telah dilakukan, pemeriksaan tahap perkembangan kematangan sel telur adanya pronukleus betina pada sitoplasma dan polar bodi I (PBI) pada perivitelin space sebagai kriteria morfologi terjadinya kematangan oosit secara *in vitro* diperoleh pada kelompok kontrol, perlakuan P₁, P₂, P₃ dan K. Inti sel oosit cukup besar terletak pada posisi eksentrik dan mengandung dua nuclei kromatik. Secara keseluruhan oosit dalam penelitian ini mempunyai diameter sekitar 140 mikron.

Kematangan sel telur secara *in vitro* pada penelitian ini tampak terlihat setelah dilakukan pewarnaan Aceto orcein 1% untuk mengamati tahap kematangannya tampak bahwa sel telur yang dikultur telah mencapai kematangan inti. Dibutuhkan pembesaran 400 X untuk pemeriksaan visual kualitatif pronukleus betina dengan pewarnaan Aceto orcein 1%. Bentuk pronukleus betina pada Gambar 4.1 tampak putih agak transparan. Perkembangan sitoplasma sangat baik dengan adanya perkembangan inti. Terjadi peregangan ikatan antar kumulus secara meluas bila dibandingkan sebelum maturasi.

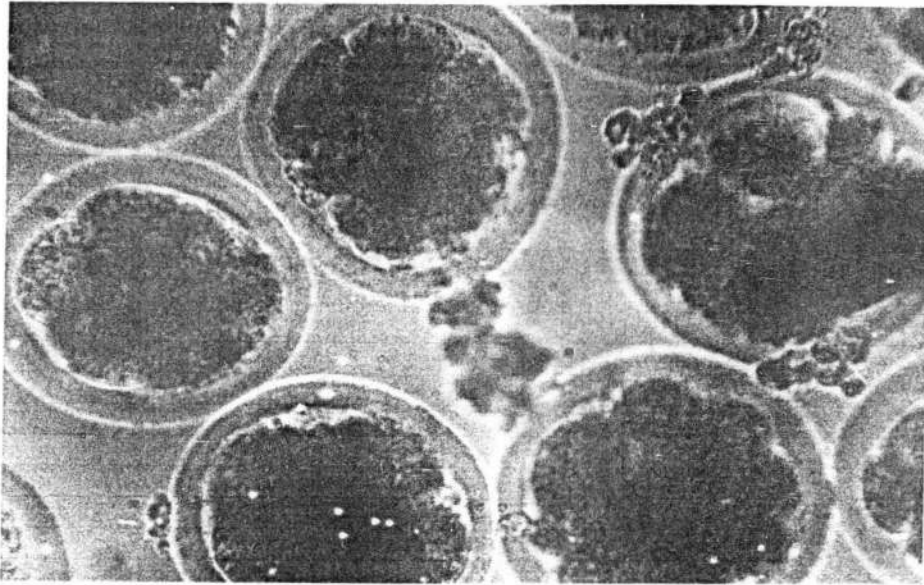


Gambar 4.1. Oosit berkumulus setelah pematangan.

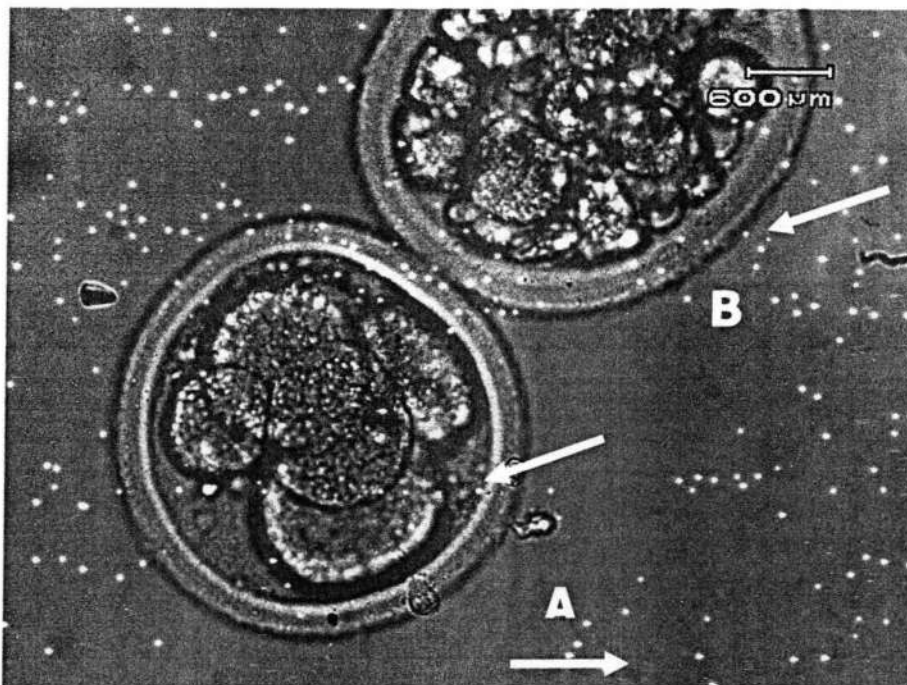
Setelah proses maturasi *in vitro* dilakukan selama 20–24 jam dengan pemberian berbagai dosis hMG hasil ekstraksi dan hMG terelusi masing-masing 1 dan 2 $\mu\text{g/ml}$ pada kelompok perlakuan dan PMSG 5 IU pada kelompok kontrol diperoleh data hasil penelitian sebagai berikut: setelah waktu kapasitasasi spermatozoa selama 3 jam selesai, segera oosit dimasukkan ke dalam media fertilisasi yang berisi sel mani. Pengamatan dilakukan selama 20–24 jam masuknya kepala sel mani kedalam *zona pellucida* lalu dari rongga perivitteline bergerak dan robeknya akrosom dan selaput kepala. Bila kepala sel mani telah mencapai sitoplasma oosit maka segera terjadi perubahan-perubahan. Polar bodi II, yang merupakan indikator telah terjadinya fertilisasi kejadian ini kecil tidak semua polar bodi II dapat dilihat karena letak oosit yang berubah-ubah, sedangkan polar bodi II berada relatif tetap pada salah satu sisi oosit yang berbentuk bola.

Demikian pula adanya pronucleus betina suatu indikasi oosit matang meskipun tidak selalu juga nampak dan pronucleus jantan menandakan adanya fertilisasi indikator dalam penelitian ini tidak digunakan karena hanya memantau perkembangan hasil fertilisasi oosit dan sperma sapi secara *in vitro* dimulai dari *cleavage* embrio selama 2 hari atau 48 jam *cleavage* diperoleh perkembangan blastomere hingga mencapai 8, 16 sel.

Hasil pengamatan secara mikroskopik perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* hingga *cleavage* menjadi 8 – 16 sel embrio dapat dilihat pada Gambar 4.2 dan 4.3.



Gambar 4.2. Perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* 8 dan 16 sel embrio dengan pembesaran 100 x. A = 8 sel, B = 16 sel.



Gambar 4.3. Perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* 8 dan 16 sel embrio dengan pembesaran 200 x. A = 8 sel, B = 16 sel.

Hasil analisis dengan uji Anava Faktorial menunjukkan bahwa, Rara-rata jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* untuk perlakuan (trial) pada berbagai waktu tersebut dapat dilihat pada table 4.1. dan 4.2.

Tabel 4.1 Hasil Uji Biologi Fertilisasi *In Vitro* Dimulai dari *Cleavage* Hingga 8-16 sel ($y_4\%$) dan Transformasi $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$ terhadap Trial Berbeda pada Berbagai Waktu

Trial	8-16 sel ($y_4\%$)	Transformasi $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
<i>h</i> MG ekstraksi 1 $\mu\text{g/ml}$	13.333 \pm 10.3704	18.3210 \pm 12.31418
<i>h</i> MG ekstraksi 2 $\mu\text{g/ml}$	14.048 \pm 9.4744	19.8000 \pm 10.75039
<i>h</i> MG elusi 1 $\mu\text{g/ml}$	17.139 \pm 12.6808	21.8950 \pm 12.50623
<i>h</i> MG elusi 2 $\mu\text{g/ml}$	12.870 \pm 12.5433	17.6880 \pm 12.93671
PMSG 5 IU	16.859 \pm 5.9250	23.9420 \pm 4.60976

Nilai rata-rata dan SD jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio hingga 8-16 sel sel pada berbagai perlakuan untuk 20 jam dan 24 jam masing-masing sebesar 12.853 ± 8.7796 dan 16.846 ± 11.3046 . Hasil tersebut tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$) (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Hasil Uji Biologi Perkembangan Fertilisasi *In Vitro* Hingga 8-16 sel ($y_4\%$) dan Transformasi $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$ terhadap Waktu Berbeda pada Berbagai Trial

Time	8 - 16sel ($y_4\%$)	Transformasi $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
20 jam	12.853 \pm 8.7796	18.5452 \pm 10.58616
24 jam	16.846 \pm 11.3046	22.1132 \pm 11.04765

Pengaruh interaksi antara perlakuan dan waktu untuk jumlah oosit yang mencapai perkembangan 8-16 sel sel embrio tidak bermakna ($p > 0,05$). Nilai rata-rata dan SD jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 8-16 sel untuk perlakuan kombinasi *h*MG ekstraksi 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *h*MG ekstraksi 1 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *h*MG ekstraksi 2 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *h*MG ekstraksi 4 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *h*MG elusi 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *h*MG elusi 1 μg -24 jam, *h*MG elusi 2 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *h*MG elusi 4 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, PMSG 5 IU-20 jam dan PMSG 5 IU-24 jam masing-masing sebesar 10.667 ± 10.588 , 16.0

± 10.588 , 8.763 ± 9.338 , 19.333 ± 6.703 , 18.056 ± 5.727 , 16.222 ± 18.081 , 9.922 ± 9.969 , 15.818 ± 15.261 , 16.859 ± 6.284 dan 16.859 ± 6.284 (Lampiran 1).

4.2 Pembahasan

Analisis Statistik Hasil Uji Biologis Pemberian ekstraksi hMG, hMG terelusi dan PMSG Terbentuknya *Cleavage Embrio Sapi In Vitro* Hingga 8 -16 sel dengan Uji Anava Faktorial Analisis statistik hasil uji biologis pemberian ekstraksi hMG, hMG dan PMSG terbentuknya *cleavage embrio sapi in vitro* hingga 8 -16 sel ($y_4\%$) dan transformasi $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$ secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1. Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Anava pola faktorial antara perlakuan (trial) dan waktu (Tabel 4.3) dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan bermakna ($p>0,05$) jumlah embrio sapi yang mencapai 4 sel baik terhadap trial, waktu, maupun interaksi antara trial dan waktu.

Tabel 4.3 Uji Anava Faktorial Hasil Uji Biologis Pemberian ekstraksi hMG, hMG terelusi dan PMSG Terbentuknya *Cleavage Embrio Sapi In Vitro* Hingga 8 -16 sel Sel

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: $\text{Arc.sin}\sqrt{(y_4\%)}$

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	21558.207 ^a	10	2155.821	17.658	.000
Trial	267.929	4	66.982	.549	.701
Time	159.133	1	159.133	1.303	.260
Trial * Time	467.327	4	116.832	.957	.442
Error	4883.557	40	122.089		
Total	26441.765	50			

a. R Squared = .815 (Adjusted R Squared = .769)

Arc.sinV(y32%)

Tukey HSD a,b

Trial	N	Subset	
		1	2
PMSG 15 IU	10	1.2800	
hMG 4 µg	10	3.0980	3.0980
hMG 1 µg	10	3.2220	3.2220
hMGdG 1 µg	10	4.9160	4.9160
hMGdG 4 µg	10		11.0740
Sig.		.792	.118

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 52.116.

- a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.
- b. Alpha = .05.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian hibah bersaing 2008 dan diaplikasikan pada hibah bersaing 2010 dari analisa data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu: FSH-LH *like* (hMG) dari urin perempuan pascamenopause menghasilkan hMG ekstraksi dan hMG terelusi untuk *cleavage* oosit sapi secara *in vitro*".

5.2 Saran

Berdasarkan hasil analisis dan temuan dalam penelitian ini dapat diberikan saran sebagai berikut :

1. hMG hasil ekstraksi dan hMG hasil elusi dapat dimanfaatkan untuk terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro* pada produksi embrio sapi.
2. Urin perempuan pascamenopause di Indonesia sebagai sumber hMG merupakan FSH-LH *like* dapat digunakan untuk hormon reproduksi yang dapat berperan dalam penanganan gangguan reproduksi pada ternak khususnya sapi.
3. "Speciment" yang berlimpah, hormon ini dapat diproduksi baik untuk kepentingan penanggulangan gangguan reproduksi pada manusia atau hewan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K. and A.H. Lichman. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. 5th. Ed. Saunders. Elsevier Science. Philadelphia.
- Ada G.2001. *Vaccines and Vaccination*. New Engl J Med.345 : 1042 – 1053.0
- Agarwal, R. Holmes, J. and H.S. Jacobs. 2000. *Follicle-Stimulating Hormone or human Menopausal Gonadotrophin for Ovarian Stimulation in in Vitro Fertilization Cycles : a metaanalysis*. *Fertil. Steril.*, 73, 338-343.
- Alcivar, A.A; R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984a. *Superovulatory Responses in FSH or Pergonal-Treated Heifers*. *Theriogenology* 22:635.
- Alcivar, A.A; R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984b. *Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone, Progesterone and Estradiol-17B in Superovulated Beef Heifers*. In: *Proc. 10 th Int. Cong. Anim. Reprod. And AI*, Vol. 3. 303.
- Alcivar, A.A; R.R Maurer and L.L Anderson. 1992. *Endocrine Changes in Beef Heifers Superovulated with Follicle Stimulating Hormone (FSH.P) or Human Menopausal Gonadotrophin*. *Department of Animal Science Iowa State University and Roman Lhruskaus*. Dept. of agriculture clay center. *J. Anim Sci* 70 : 224 - 231.
- Anonimous. 1994. *IIMS Manual for hMG. Pergonal Serono Singapore MIMS Asia*. 135. Cecil street.
- Artama, W.T. 1992. *Antibodi Monoklonal. Theori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan*. PAU-Bioteknologi. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta
- Aulanni'am. 2003. *Analisis Antibodi Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida-3 Terdeglisosilasi (bZP3dG) Untuk Pengembangan Vaksin Kontrasepsi*. Penelitian Experimental Laboratoris. Desertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya.3-150.
- Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Tehnik Analisis Biomolecular*. Laboratorium Biomolecular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang
- Aulanni'am. 2005. *Protein & Analisisnya*. Penerbit Citra Mentari Group, Malang.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Laboratorium Biomolecular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang.
- Austyn J, M. and K.J. Wood.1993. *Principle of Cellular and Molecular*.
- Baratawidjaja K.G.1996. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 68-72.

- Baratawidjaja K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi keenam. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 51-70.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi ketujuh. Cetakan ke-1. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Gaya Baru. Jakarta.
- Berg, J.M, J.L. Tymoczko and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th edition. W. H. Freeman and Company.
- Bischof, P. and Islami. 2003. *Sexual Hormones. 8th Post graduate Course for Training in Reproductive Biology*. Departement of Obstetric and Gynecology Geneva University Hospita. Geneva Foundation for medical Education and research.
- Burgess, G.W. 1995. *Teknologi ELISA Dalam Diagnosa dan Penelitian*. terjemahan: Ariama, W.T. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta
- Cheng, K.W. 1976. *Purification and Properties Bovine Pituitary Follitropin*. Dept. Of Physiology Fac. of Med. Univ. of Manitoba Winnipeg, Manitoba. Canada. *Biochen. J.* (159) : 651 – 659.
- Clancy J. 1998. *Basic Concept in Immunology : A Student's Survival Guide*. Th McGraw-Hill Co New York.p.91-99.
- Critser, E. S.; J. K. Critser, R.P. Winch, and C. Eilts. 1982. *Efficacy of Pergonal as a Superovulatory Drug in Cattle*. *Theriogenology* 17: 83.
- Crowther, J.R. 1995. *ELISA: Theory and Practice*. Humana Press Inc. New Jersey.
- Daya, S., Gunby and J., Hughes. 1995. *Follicle-Stimulating Hormone Versus human Menopausal Gonadotrophin for In Vitro Fertilization Cycles: a Meta-analysis*. *Fertil. Steril.* (64) : 347 - 354.
- Daya, S and Gunby, J. 1999. *Recombinant Versus Urinary Follicle Stimulating Hormone for Ovarian Stimulation in Assisted Reproduction*. *Hum.Reprod.* (14) : 2207 - 2215.
- Direktur Jendral Peternakan.2006.*Produksi Daging, Telur dan Susu*.http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm.
- Dorrington, J.H. 1979. *Pituitary and Placental Hormone*. In C.R. Austin and R.V. Short (Ed.) : *Reproduction in Mammals. Book 7. Mechanism of Hormone Action*. Cambridge Univ. Press. Melbourne Sydney.
- Findlay, JK. 1993. *An Update on the Role of Inhibin, Activin, and Follistatin as Local Regulators of Folliculogenesis*, *Biol of Reprod.* 48 : 15 - 20.
- Fox, K.M.; J.A. Dias and P.V. Roey. 2001. *Three-Dimensional Structure of Human Follicle-Stimulating Hormone*. *Molecular Endocrinology*. Vol. 15. 378 – 389.

- Francis LB. and MW. Phyllis. 2003. *Minireview – Nonhuman Primate Models of Menopause Workshop*. *Biology of Reproduction*. Vol. 68. 10 – 18.
- Frandsen, R.D., W. Lee Wilke and A. Dee Falls. 2003. *Anatomy and Physiology of Farm Animals*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Gee, DM.; K. Flurkey and CE. Finch. 1983. *Aging and the Regulation of Luteinizing Hormone in C57BL/6J Mice : Impaired Elevations After Ovariectomy and Spontaneous Elevations at Advanced Ages*. *Biology of Reproduction*. Vol. 28. 598 – 607.
- Giudice, F. Crisci, and C. Eshkol. 1994. *Composition of Commercial Gonadotrophin Preparations Extracted from human Post-Menopausal Urine : Characterization of Non-Gonadotropin Proteins*. *Hum. Reprod.* (9) : 2291 - 2299.
- Goer, J. 1993. *Immunochemical Techniques Laboratory Manual*. Academic Press, Harcourt Brace Javanovich. Publisher San Diego. California.
- Gonzalez, A. J.G. Lussier, T. D. Carruthers, B.D. Murphy, and R.J. Mapletoft. 1990. *Superovulation of Beef Heifers with Follitropin: a New FSH Preparation Containing Reduced LH activity*. *Theriogenology* (33) : 519.
- Gordon, I. 1993. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cab. international. Dept of Anima Sci 2nd Prod Univ College Dublin, Ireland. .30, 31,100, 128.
- Goto, K and Iritani, A. 1992. *Oocyte Maturation and Fertilization*. *Anim Reprod Sci* (28) : 407 – 413. Elsevier Science Publisher B.V; Amsterdam.
- Hadley, M.E., 1992. *Endocrinology*. Third Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey 07632.
- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction In Farm Animal. Lea and Febiger*. Philadelphia. 98-99. 161 – 162. 392-404.
- Hardjopranjoto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press, Surabaya
- Harlow, E and D, Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Haslam and Z. Sandra. 2003. *Ovariectomized Mouse Model for human Menopause*. *Pharmaceutical Patents*. Vol. 24.
- Henderson, B., M. Wilson, R. McNab and A.J. Lax. 1999. *Cellular Microbiology Bacteria-Host Interactions in Health and Disease*. John Wiley and Sons Ltd. London.

- Hillier S.G.; E.I. Young, P.J. Illingworth, D.T. Baird, R.H. Schwall and A.J. Mason. 1991. *Effect of Recombinant Activin on Androgen Synthesis in Cultured Human Thecal Cells. journal of Clinical Endocrinology and Metabolism (72) : 1206 - 1211.*
- Huang FJ, Kao Chung L, Fu Tsai K, Meng Yin T, Chin Yang C, Hsuan Wei H, Yi Chi L and Shiuh Young Chang. 2004. *Human Cumulus-Free Oocyte Maturation Profile and in Vitro Developmental after Stimulation with Recombinant Versus Urinary FSH.* Dept Of Obstetrics and Gynecology Chang Gung Memorial Hospital Taiwan. *Human Rep.* Vol 19 : 306-315.
- Hung Yu Ng E, Estella Yee LL, William SBY and Pak Chung Ho. 2000. *hMG is as Good as Recombinant Human FSH in Term of Oocyte and Embryo Quality : a Prospective Randomized Trial* Dept. of obstetrics and gynaecology, queen mary hospital, the University of Hongkong.
- Imthurn, B.; E. Macas, M. Rosselli. 1996. *Nuclear Maturity and Oocyte Morphology After Stimulation with Highly Purified Follicle Stimulating Hormone Compared to human Menopausal Gonadotrophin.* *Hum. Reprod.*, (11) : 2387 - 2391.
- Ireland J.J. and J.F. Roche. 1983. *Development of Non Ovulatory Antral Follicles in Heifers: Changes in Steroids in Follicular Fluid and Receptors for Gonadotropins* *Endocrinology* (112) : 150 – 156.
- Ismudiono, 1999. *Upaya Meningkatkan Angka Kebuntingan Melalui Inseminasi dalam Upaya Penyerentakan Birahi Pada Sapi Perah.* Lembaga Penelitian UNAIR.
- Jacob, S., L. Drudy, R. Conroy. 1998. *Outcome from Consecutive In-Vitro Fertilization/ Intracytoplasmic Sperm Injection Attempts In The Final Group Treated with Urinary Gonadotrophins and The First Group Treated with Recombinant Follicle Stimulating Hormone.* *Hum. Reprod.*, (13) : 1783 – 1787.
- Jawetz, J., L. Melnick and E.A. Adeberg. 1991. *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan (Review of Medical Microbiology).* Edisi ke-16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Kash and Menon. 1998. *Identification of a Hormonally Regulated Hormone / human Chorionic Gonadotropin Receptor m RNA Binding Protein. Incresed mRNA Binding During Receptor Down Regulation.* Departements Genecology, University of Michigan Medical School Ann Arbor. *J.Biol.Chem.* Vol. 273 (17) : 10658 – 10664.
- Kerr, M.A. and R. Thorpe.1994. *Immunochemistry Labfax.* Bios Scientific Publisher. Academic Press. 43-80.
- Knight P.G. 1991. *Identification and Purification of Inhibin and Inhibin-Related Proteins* *J, Rep and Fert* (43) : 111 – 123.

- Koninckx P.R. 2001. *Meta Analysis of Recombinant and Urinary FSH*. Dept of Obstetric gynaecology Univ. Hospital Gasthuisberg Lauven Belgium. Human Reprod Vol 16 (1) : 196 - 197.
- Kresno, S.B. 2007. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Edisi keempat. Cetakan ke-3. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Kubo, H. 2005. *A Systematic Review of Controlled Ovarian Stimulation (COS) with Recombinant Follicle-stimulating Hormone (rFSH) versus Urinary Gonadotrophin in GnRh Protocols for Pituitary Desensitization in Assisted Reproduction Cycles*. J. Mamm. Ova. Res. (22) : 2 - 12.
- Lunenfeld B. 2004. *Historical Perspective in Gonadotrophins Therapy*. Faculty of life Science Barhan University Ramat gan 52900. Israel. Human Reprod. 1-31.
- Madyawati, S.P., Ismudiono, P. Srianto, A. Samik dan T. Sadjito. 1994. *Waktu Timbulnya Birahi dan Angka Kebuntingan pada Sapi Perah yang Diberi Hormon PMSG*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mahaputra, L.; R. Ernawati dan D. Simomangkir. 1999. *Pembuatan Embryo Jantan dan Betina Secara Terpisah Serta Pengembangan Cell Line Sebagai Pemicu Pertumbuhan dengan Pengetahuan Teknik Bayi Tabung pada Sapi*, Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/I.
- Mahaputra, dan D. Simomangkir. 1999. *Supplement for In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Eggs; A Comparison and Estrogen, Estrus Mare Serum and ESTRUS Cow Serum*. Folia Medica Indonesiana Airlangga University School of Medicine. Vol XXXV.
- Mahaputra, L. 2007. *Bioaktivitas Berbagai Serum Kuda Sebagai Substitusi Aditif FSH, Estrogen dan LH Saat Maturasi Oosit dalam Teknik Bayi Tabung pada Sapi*. Jurnal Bio Sains Pasca Sarjana Unair. 9. 29-24.
- Malhi, P.S.; GP. Adams and J. Singh. 2005. *Bovine Model for Study of Reproductive Aging in Women : Follicular, Luteal and Endocrine Characteristics*. Biolology of Reproduction. Vol. 73 : 45 - 53.
- Martino, A.; T. Mogas, Paloma, M.J and M.T. Paramio. 1994. *In Vitro Maturation and Fertilization of Prepubertal Goat Oocytes*. Theriogenology. (43) : 473 - 485.
- Mather J.P., T.K. Woodruff and L.A. Krummen. 1992. *Paracrine Regulation of Reproductive Function by Inhibin and Activin Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (201) : 1 - 15.
- Mayer, L. and P. Hoyer. 2005. *A New Hormonally Relevant Model for human Menopause*. Jax[®] Mice Literatur. No. 496.

- Mercan, R.; J.F. Mayer, D. Walker. 1997. *Improved Oocyte is Obtained with Follicle Stimulating Hormone Alone Than With Follicle Stimulating Hormone/ human Menopausal Gonadotrophin Combination. Hum. Reprod.* (12) : 1886 - 1889.
- Monger, P.; T.K. Monniaux and L.A. Krummen. 1993. *Changes in Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I), IGF-II and Their Binding Proteins During Growth and Atresia of Ovine Ovarian Follicles Endocrinology.* (132) : 1438 -1466.
- Motta M.; M. Zanisi, and F. Piva F. 1996. *Pituitary Hormones and Related Peptides*, M. Motta, M Zanisi and F. Piva, Ed., Academic Press Inc., New York, Scripps News, A publication of Scripps Laboratories, INC. Volume 10.
- Mustofa, I.; E.D. Poetranto dan A. Wiyono. 1999. *Efektivitas Pemakaian PGf2 α Intrauterin Dibandingkan Cara Intramuskuler untuk Gertak Birahi pada Kambing.* FKH UNAIR.
- Nalbandov, A.V. 1990. *Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas.* Edisi Ketiga. Diterjemahkan oleh Soenarjo Kema. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Norris, J.R. dan A.K. Varma.1992. *Method In Microbiology.* Vol 24. Academic Press Inc. San Diego.
- Nozaki, M.; F. Mitsunaga and K. Shimizu. 1995. *Reproductive Senescence in female Japanese Monkeys (Macaca fuscata) : Age – and Season Related Changes in Hypothalamic – Pituitary – Ovarium Function and Fecundity Rates.* Biology of Reproduction. Vol. 52. 1250 – 1257.
- Rantam, FA. 2003. *Metode Imunologi.* Cetakan Pertama. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 79 – 161.
- Ratnani, H. dan H.A. Hermadi. 1992. *Pengaruh hMG Pergonal Serono Terhadap Birahi dan Kebuntingan pada Kambing.* Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Robert K and A. Peter. 1993. *Harper's Biochemistry.* 23rd edition. Preble Hall International Inc. USA.
- Roche F.J. 1996. *Control and Regulation of Folliculogenesis-a Symposium in Perspective. Reviews of Reproduction* (1) : 19 – 27. Department of Animal Husbandry and Production, Faculty of Veterinary Medicine, University College, Dublin 4, Ireland.
- Rogers, M.; J.D. McLoughlin, A. Lambert. 1995. *Variability in the Immunoreactive and Bioactive Follicle Stimulating Hormone Content of human Urinary Menopausal Gonadotrophin Preparation. Hum. Reprod.,* (10) : 1982 - 1986.
- Salisbury, G.W. dan N.L. van Denmark. 1985. *Fisiologi Reproduksi dan IB pada Sapi.* Gajah Mada University Press. hal. : 90 – 104.

- Shoham, Z. 2007. *Clinical experience with recombinant human FSH*. Department of Obstetrics and Gynecology, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel
- Silitonga, H.P. 2006. *Era Baru Pengobatan Infertilitas dengan Gonal-F (Follitropin Alpha/FSH Recombinat)*. Product Department PT. Dipa Pharmalab Intersain Divisi Serono.
- Simoni M.; J. Gromoll and N. Chlages. 1997. *The Follicle Stimulating Hormone Receptor : Bio Chemistry, Molekuler Biology, Physiology and Pathophysiology*. Institute of Reproductive Medicine of the University Domagkstrabe 11, D-48129 Muster endocrine reviews 18 : 739 - 773.
- Sirard M.A. and R.D. Lambert. 1985. *In Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocyte Obtain by Laparoscopy*. Biol. Reprod (33) : 905-918.
- Srianto, P. 1995. *Profil Progesteron pada Induksi Kembar dengan Menggunakan Hormon PMSG*. Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Subowo. 1993. *Immunologi*. Angkasa. Bandung.
- Sudo S.; M. Kudo, Wada, D. Sato, J.W. Aaron and S. Fujimoto S. 2002. *Genetic and Functional Analysis of Polymorphisms in the human FSH Receptor Gene*. Reproductive endocrinology. Molecular Human Reproduction. Vol 8 : 893 - 899.
- Suwarno, R. Ernawati, A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani dan A.F. Rantam. 2003. *Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji Elisa. Laboratorium Virologi dan Immunologi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Suzuki O.; M. Kaura, Y. Noguchi, K. Takano, Y. Yamamoto and Matsuda. 2003. *Optimization of Superovulation Induction by human Menopausal Gonadotrophin in Guinea Pigs Base on Follicular Waves and FSH Receptor Homologies*. Dept. of veterinary science, National Institut of Infection Diseases Tokyo Japan. Mol. Repro Dev. 64 : 219 - 225.
- Teissier, M.P.; H. Chable, and S. Paulhac. 1999. *Recombinant human Follicle Stimulating Hormone Versus human Menopausal Gonadotrophin Induction : eEffect in Mature Follicle Endocrinology*. Hum. Reprod. (14) : 2236 - 2241.
- Thiruppathi; S. Shatavi, J.A. Dias, Radwanska and J.L. Luborsky. 2001. *Gonadotrophin Receptor Expression on human Reproduction*. Vol 7: 697 - 704.
- Tizard, I. 1988. *Pengantar Immunologi Veteriner*. Edisi kedua. Terjemahan: Partodiredjo, M. Airlangga University Press. Surabaya
- Vilk, W.A. 1992. *Basic Microbiology*. 7th .Ed. Harper Collins Publisher Inc. USA.

- Webb, R.; P.C. Garnsworthy, J.G. Gong and D.G. Armstrong. 2004. *Control of Follicular Growth : Local Interactions and Nutritional Influences*. J. anim. Sci. (E. suppl.) E63 – E74.
- Weissman, A.; J. Meriono and S. Ward. 1999. *Intracytoplasmic Sperm Injection After Follicle Stimulation with Highly Purified human Follicle-Stimulating Hormone Compared with Human Menopausal Gonadotrophin*. J. Assist. Reprod. Genet. (16) : 63 - 68.
- Westergaard L.G.; K. Erb, Laursen, and P.E. Rasmussen. 1996. *The Effect of human Menopausal Gonadotrophin and Highly Purified Urine Derived Follicle Stimulating Hormone on The Outcome of In Vitro Fertilization in Down Regulated Normogonadotrophic Women*. Human Reprod. 11 : 1209 - 1213.
- Westergaad L.G. 1999. *Monotropin LH Content and Assisted Reproduction Out Come. The First world congress on controversies in obstetrics*. Gynecology and Infertility Prague, Czech Republik.
- Woodruff, T.K. and A. Pangas. 2000. Trends in Endocrinology and Metabolism. Journal Reproduction: 309-314
- Zara J. and R.K. Naz. 1998. *The Role Of Carbohydrate in mammalian sperm egg intereaction: How Importan Are Carbohydrate epitopes?* Front Biosci. 15 : 1028 - 1038.

Lampiran 1.

Statistik Hasil Uji Biologis Pemberian hMG, hMGdG dan PMSG Terbentuknya Cleavage Embrio Sapi *In Vitro* Hingga 8 Sel dengan Uji Anava Faktorial

Univariate Analysis of Variance

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Trial	1	hMG ekstraksi urine 1 µg	10
	2	hMG ekstraksi urine 2 µg	10
	3	hMG elusi 1 µg	10
	4	hMG elusi 2 µg	10
	5	PMSG 5 IU	10
Time	1	20 jam	25
	2	24 jam	25

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Arc.sinV(y4%)

Trial	Time	Mean	Std. Deviation	N
hMG ekstraksi urine 1 µg	20 jam	15.3380	13.24106	5
	24 jam	21.3040	11.98401	5
	Total	18.3210	12.31418	10
hMG ekstraksi urine 2 µg	20 jam	13.7860	12.04184	5
	24 jam	25.8140	4.96066	5
	Total	19.8000	10.75039	10
hMG elusi 1 µg	20 jam	24.8980	4.42001	5
	24 jam	18.8920	17.60204	5
	Total	21.8950	12.50623	10
hMG elusi 2 µg	20 jam	14.7620	12.75582	5
	24 jam	20.6140	13.87234	5
	Total	17.6880	12.93671	10
PMSG 5 IU	20 jam	23.9420	4.88939	5
	24 jam	23.9420	4.88939	5
	Total	23.9420	4.60976	10
Total	20 jam	18.5452	10.58616	25
	24 jam	22.1132	11.04765	25
	Total	20.3292	10.85897	50

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Arc.sinV(y4%)

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Model	21558.207 ^a	10	2155.821	17.658	.000
Trial	267.929	4	66.982	.549	.701
Time	159.133	1	159.133	1.303	.260
Trial * Time	467.327	4	116.832	.957	.442
Error	4883.557	40	122.089		
Total	26441.765	50			

a. R Squared = .815 (Adjusted R Squared = .769)

Post Hoc Tests

Trial

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Arc.sinV(y4%)

Tukey HSD

(I) Trial	(J) Trial	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
hMG ekstraksi urine 1 µg	hMG ekstraksi urine 2 µg	-1.4790	4.94144	.998
	hMG elusi 1 µg	-3.5740	4.94144	.950
	hMG elusi 2 µg	.6330	4.94144	1.000
	PMSG 5 IU	-5.6210	4.94144	.786
hMG ekstraksi urine 2 µg	hMG ekstraksi 1 µg	1.4790	4.94144	.998
	hMG elusi 1 µg	-2.0950	4.94144	.993
	hMG elusi 2 µg	2.1120	4.94144	.993
	PMSG 5 IU	-4.1420	4.94144	.917
hMG elusi 1 µg	hMG ekstraksi 1 µg	3.5740	4.94144	.950
	hMG ekstraksi urine 2 µg	2.0950	4.94144	.993
	hMG elusi 2 µg	4.2070	4.94144	.913
	PMSG 5 IU	-2.0470	4.94144	.994
hMG elusi 2 µg	hMG ekstraksi 1 µg	-.6330	4.94144	1.000
	hMG ekstraksi urine 2 µg	-2.1120	4.94144	.993
	hMG elusi 1 µg	-4.2070	4.94144	.913
	PMSG 5 IU	-6.2540	4.94144	.713
PMSG 5 IU	hMG ekstraksi 1 µg	5.6210	4.94144	.786
	hMG ekstraksi urine 2 µg	4.1420	4.94144	.917
	hMG elusi 1 µg	2.0470	4.94144	.994
	hMG elusi 2 µg	6.2540	4.94144	.713

Based on observed means.

Homogeneous Subsets

Arc.sinV(y4%)

Tukey HSD^{a,b}

Trial	N	Subset
		1
hMG elusi 2 µg	10	17.6880
hMG ekstraksi urine 1 µg	10	18.3210
hMG ekstraksi urine 2 µg	10	19.8000
hMG elusi 1 µg	10	21.8950
PMSG 5 IU	10	23.9420
Sig.		.713

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

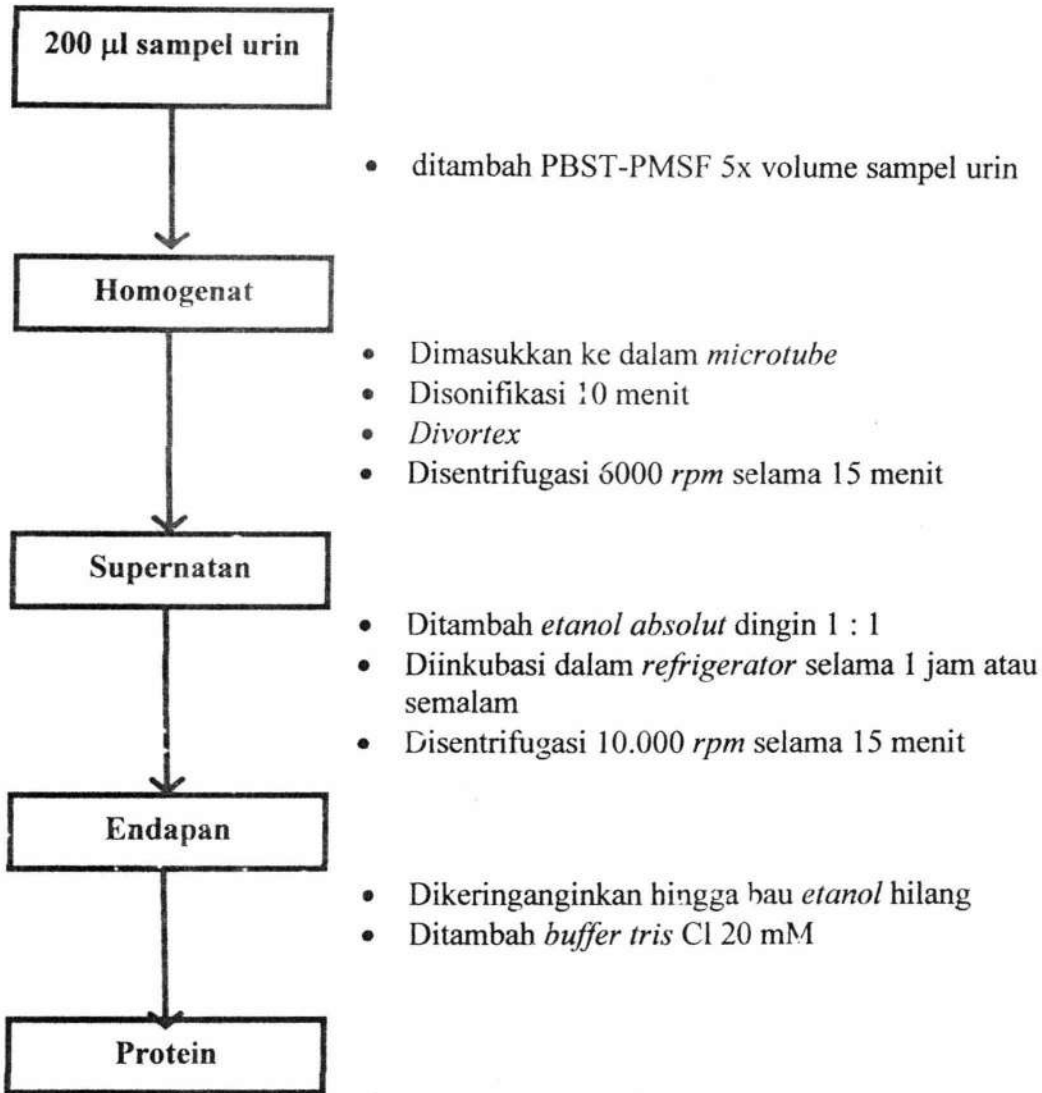
Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square(Error) = 122.089.

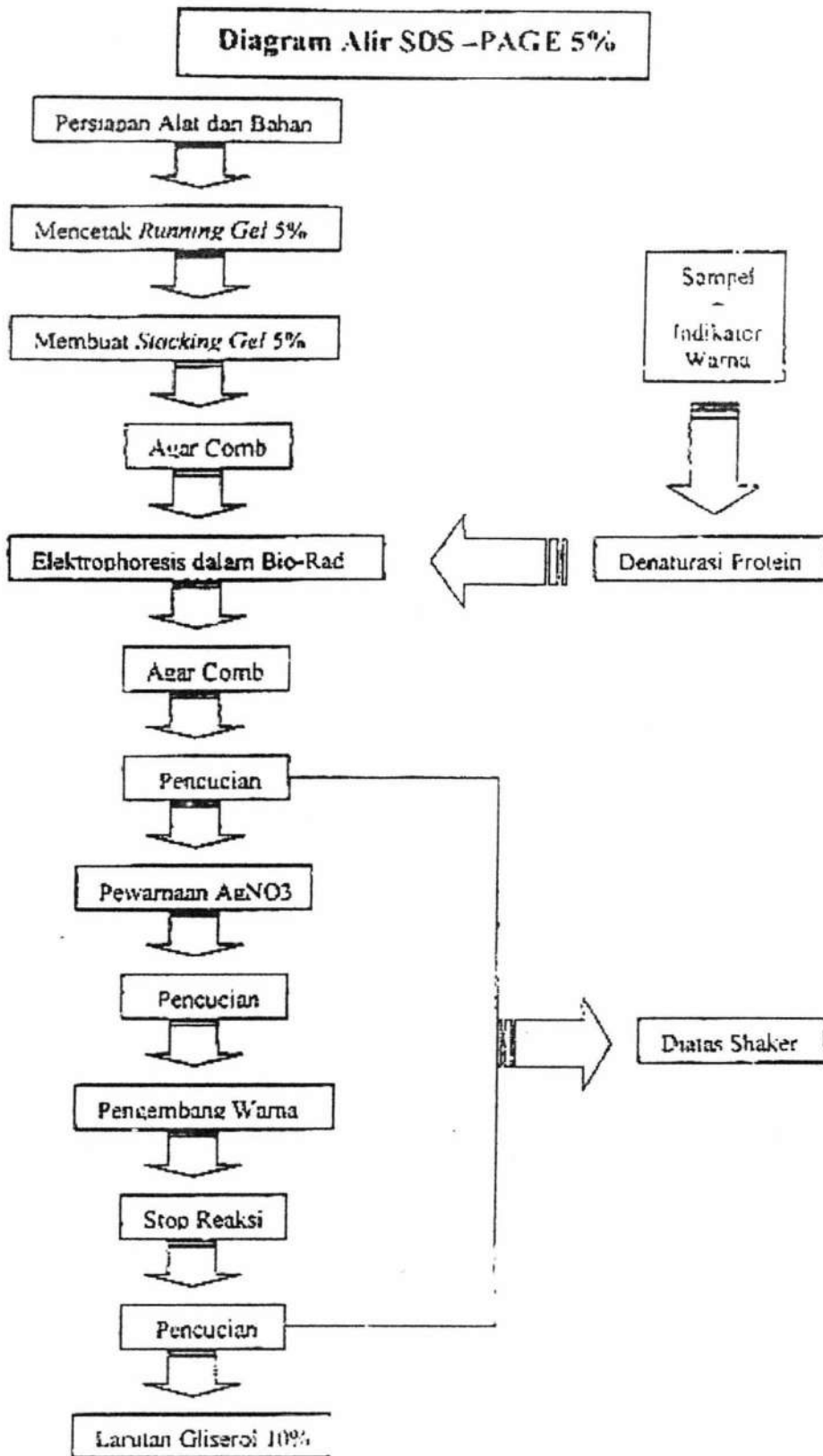
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

b. Alpha = .05.

Lampiran 2. Prosedur Ekstraksi Urine Menopause



Lampiran 3. Alir Kerja SDS – PAGE 5% (Ratam, 2003).



Lampiran 4. Pembuatan Reagen**1. Phosphate Buffer Saline pH 7,4**

No.	Bahan	Jumlah
1.	KCL	0,1 g
2.	KH ₂ PO ₄	0,1 g
3.	NaCl	4 g
4.	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O (berurutan sambil diaduk)	1,08 g
5.	ddH ₂ O	Hingga 500 mL

2. Phosphate Buffer Saline-Tween 0.05%

No.	Bahan	Jumlah
1.	PBS	100 mL
2.	Tween 20	50 µL

3. PBST-PMSF 4mM (Poly Methyl Sulfonyl Flouride)

1.	PBST	90 mL
2.	PMSF dalam DMF	10 mL

4. Lower Gel Buffer pH 8,8

No.	Bahan	Jumlah
1.	Tris Base	1,82 g
2.	SDS	0,04 g
3.	ddH ₂ O	10 mL

5. Upper Gel Buffer pH 6,8

No.	Bahan	Jumlah
1.	Tris Base	0,75 g
2.	SDS	0,04 g
3.	ddH ₂ O	10 mL

6. T-acryl 39%

No.	Bahan	Jumlah
1.	Bisakrilamid	0,08 g
2.	Akrlamid	2,92 g
3.	ddH ₂ O	10 mL

7. Running Buffer pH 8,3

No.	Bahan	Jumlah
1.	Tris Base	3,03 g
2.	Glisin	14,4 g
3.	SDS	0,04 g
4.	ddH ₂ O	Sampai 1 L

Lanjutan Lampiran 6

8. RSB (Reducing Sample Buffer)

No.	Bahan	Jumlah
1.	SDS 10%	0,2 mL
2.	B-merkaptotanol	0,05 mL
3.	Gliserol 10%	0,2 mL
4.	Bromphenol Blue	0,025 mL
5.	ddH ₂ O	0,4 mL

9. APS 10%

No.	Bahan	Jumlah
1.	APS	0,1 g
2.	ddH ₂ O	1 mL

10. Staining

No.	Bahan	Jumlah
1.	Comassie Brilliant Blue	0.25 g
2.	Metanol Absolut	45,4 mL
3.	Asam asetat glasial	9,2 mL
4.	ddH ₂ O	Sampai 100 mL

11. Destaining

1.	Metanol Absolut	70 mL
2.	Asam asetat glasial	70 mL
3.	ddH ₂ O	Sampai 100 mL

12. NaOH 1 N

No.	Bahan	Jumlah
1.	NaOH	4 g
2.	Akuades	100 mL (80 mL digunakan untuk melarutkan dan sisanya ditambahkan pada labu ukur hingga tanda batas)

13. NaIO₄

No.	Bahan	Jumlah
1.	NaIO ₄	0,021 g
2.	GAB	Sampai 10 mL

14. detection Reagent (DR)

No.	Bahan	Jumlah
1.	DR	0,05 g
2.	NaOH 1 N	Sampai 10 mL

Lampiran 5. Formula Bahan Kimia (*Washing Medium*)**TL HEPES STOCK (*Washing Medium*) (Mahaputra dkk., 1999)**

Zat Kimia	mM akhir	g/500 ml
NaCl	114	3,33
KCl	3,2	0,120
NaHC03	2	0,084
NaH2P04H20	0,4	0,028
Atau		
Na Lactat (60% syr)	10	930 u
Hepes	10	1,200
Penicillin	100 IU / ml	0,0325
Phenol Red	-	0,005
CaCl22H20	2,0	0,150
MgCl126H20	0,5	0,050

Cara Membuat :

1. Semua bahan kimia dicampur dan ditambahkan T.J Baker sebanyak volume yang diinginkan lalu di kocok sampai semuanya larut. Kemudian diusahakan pada volume akhir, pH menjadi 7,4 dengan osmolaritas 255 – 270 omosm.
2. Larutan difilter dan dimasukkan dalam botol steril dan simpan dalam lemari es 4 derajat celcius untuk 1-2 minggu.

TL Hepes (*Washing Medium*)(Mahaputra,1999)

Zat Kimia	100 ml	50 ml
TL Hepes Stock	99 ml	49,5 ml
Pyruvat	1,0 ml	0,5 ml
Gentamycin	50 ul	25 ul
BSA Fraksi V	0,300 g	0,150 g

Semua bahan dicampur dan masukkan di dalam waterbath 39 °C, setelah larut disaring dengan milipore 0,22 um.

Lampiran 6. Formula Bahan Kimia Media Maturasi dan Fertilisasi (Mahaputra dkk., 1999)

STOCK TCM 199 (Maturasi) :

1000 ml

Medium 199 (powder)	9,9 gram
NaHC03	2,2 gram

Mediun Maturasi : TCM 199

Stock TCM 199	9 ml
FCS	1 ml
Pyruvat	100 ul
Gentamycin	5 ul

Media pencuci sperma atau media fertilisasi (Earle's balanced salt solution) terdiri dari:

EBSS	0,87 g
pyruvate	100 mg
BSA fraction V FAF	2,5 g
gentamycine	2,5 mg
aquadest	100 ml
pH 7,7 dengan NaOH 1 N	
filter stok dengan millipore 0.22 µm	

Lampiran 7. Cara kerja Pewarnaan *Aceto Orcein* 1%

PEWARNAAN ACETO ORCEIN

(Untuk pewarnaan Pronukleus setelah 18-20 jam)

Media pewarna : *Aceto Orcein* 1%

- | | |
|----------------|---------|
| 1. Orcein | 1.0 Gr |
| 2. Acetic Acid | 45.0 ml |

Cara Kerja :

1. Panaskan Acetic Acid (dalam baker glass) dengan bunsen selama 20 detik; dan tambahkan Orcein.
2. Campur hingga merata dan segera angkat dari api, taruh pada suhu kamar.
3. Setelah dingin (= suhu kamar) tambahkan 55 ml distilled water (DW)
4. Filtrasi
5. Taruh dalam botol gelap dan tutup rapat. Simpan di tempat yang gelap (bisa digunakan selama 6 bulan).

Media Penghilang Warna : *Aceto Glycerol*

- | | |
|----------------|-------|
| 1. Acetic acid | 20 ml |
| 2. Glycerin | 20 ml |
| 3. DW | 60 ml |
4. Campur hingga merata dan simpan dalam botol gelap dan tutup rapat. Simpan di tempat yang gelap (bisa digunakan selama 6 bulan)

Media Fiksasi

- | | |
|--------------------|------------|
| 1. Acetic Acid | 1.0 bagian |
| 2. Ethanol absolut | 3.0 bagian |
3. Simpan dalam suhu kamar dalam betol tertutup rapat (dalam ruang gelap)

Prosedur Penawaran

1. Setelah difiksasi selama 3-4 hari, ambil gelas objek perlahan-lahan.
2. Teteskan staining media (*Aceto Orcein*) pada salah satu sisi cover glass dengan menggunakan potongan kertas filter, sehingga media pewarna mewarnai oosit.
3. Diamkan pewarnaan selama 1 menit : tekan lagi perlahan-lahan bila oosit tidak terfiksasi dengan baik (bergerak).
4. Dengan cara yang sama, gantikan media pewarna dengan media penghilang warna (*Aceto Glycerol*) sampai semua warna terhisap.
5. Fiksasi ujung cover glass dengan cutex bening.
6. Amati di bawah mikroskop.

**SINOPSIS PENELITIAN
HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI
TAHUN ANGGARAN 2010- 2011**



Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium

Peneliti :

**Dr.HERRY AGOES HERMADI, MSi., drh.
Prof.Dr. WURLINA, MS., drh.
Prof. MAS'UD HARIADI, MPhil., drh., PhD.**

**DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDRAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
Sesuai Dengan Surat perjanjian pekerjaan penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 016/016/SP2H/PP/DP2**

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA
TAHUN 2010**

I.PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Salah satu gangguan reproduksi yang disebabkan oleh faktor hormonal sering terjadi pada sapi dapat mengganggu proses maturasi, fertilisasi sel telur dan produksi embrio, adalah hypofungsi ovarium. Prioritas penanggulangan gangguan keseimbangan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang rendah pada hypofungsi ovarium adalah membenahi penyebab utamanya seperti, faktor manajemen, ransum pakan sapi yang cukup dengan kualitas yang baik dan seimbang, diharapkan *Body Score Condition* (BSC) telah mencapai nilai lebih dari dua, dilanjutkan dengan pemberian kombinasi FSH-LH atau FSH-LH *like*. Preparat FSH-LH *like* yang dimaksud sebagai contoh adalah *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) dan *human Menopause Gonadotrophin* (hMG) (Alcivar *et al.*, 1992; Hadley, 1992; Harjopranto, 1995; Roche, 1996).

Kebutuhan hormon *gonadotrophin* untuk tujuan terapi kemajiran dan superovulasi pada produksi embrio sapi selama ini dipenuhi dari PMSG, *human Chorionic Gonadotrophin* (hCG), FSH - LH dari ekstrak *hypofisa* hewan dan FSH - LH recombinan produk bioteknologi. Penggunaan hMG untuk superovulasi pada sapi potong pertama kali diperkenalkan oleh Alcivar *et al.* (1992) Penelitian pendahuluan dengan menggunakan hMG untuk induksi birahi dan kebuntingan pada ternak kambing pertama dilakukan di universitas airlangga menunjukkan hasil yang cukup baik (Ratnani dan Hermadi, 1992). Sampai akhir tahun 1995, kebutuhan dunia akan hormon *gonadotrophin* yang berasal dari urin perempuan menopause dipenuhi dari **China, India, Eropa dan Amerika Latin** untuk pabrik hMG (*Menotropin*) di USA. Konsumen hMG pun terbatas pada kesehatan reproduksi manusia dan tidak pada hewan (Lunerfeld, 2004).

hMG yang dihasilkan dari urin perempuan menopause masih memberikan efek terapi yang baik dan relevan pada perempuan resipien atau penderita infertil, bahkan setelah

terapi hMG dapat dilanjutkan langsung dalam proses *In Vitro Maturasi* (IVM) dan *In Vitro Fertilisasi* (IVF) pada manusia (Daya *et al.*, 1995; Kubo, 2005). Terapi dengan hMG menghasilkan koleksi oosit dan perkembangan embrio yang sangat memuaskan, yang hampir sama bila dibandingkan dengan menggunakan *recombinant human FSH* (rhFSH). Pemberian hMG yang dilanjutkan dengan perlakuan IVF dapat memicu mitosis oosit hingga fase *metafase* (Agarwal *et al.*, 2000; Imthurn, *et al.* 1996; Mercan *et al.*, 1997). hMG efektif terhadap terapi infertilitas maupun perlakuan sebelum IVF untuk merangsang proses maturasi folikel, ovulasi dan respon ovarium, serta pertumbuhan embrio yang dihasilkan disamping harganya yang jauh lebih murah (Huang *et al.*, 2004; Koninckx, 2001; Westergaard *et al.*, 1996). Pada hewan ternak, hMG mempunyai peluang untuk dikembangkan karena sumbernya yang mudah diperoleh (Alcivar *et al.*, 1992).

Sumber hMG diperoleh saat perempuan memasuki usia 50 tahun. Diperkirakan menopause pada perempuan terjadi saat usia 50 tahun yang ditandai dengan penurunan aktivitas ovarium karena folikel primordial tidak ada lagi, sedangkan kelenjar *hypofisa anterior* tetap memproduksi FSH-LH. Pada saat itu perempuan memasuki gejala *peri – menopause* dan berakhir pada kondisi *post – menopause*. Kondisi menopause menyebabkan kadar hormon *estrogen* dan *progesteron* menurun karena tidak ada proses *steroidogenesis* dan disertai dengan peningkatan kadar hormon FSH-LH yang tinggi dalam serum darah terekspresi di dalam urin, disebut sebagai hormon kombinasi FSH-LH *Like* atau dikenal sebagai hMG (Mayer and Hoyer, 2005).

ilik (Hara *et al.*, 2007; Zara and Naz, 1998).

Selaras dengan kemajuan bioteknologi dibidang peternakan di Indonesia khususnya **embrio transfer** dalam rangkah peningkatan populasi ternak sapi bank embrio di UPT Cipelang sedang digalakkan. Hormon FSH – LH sangat dibutuhkan keberadaanya untuk proses produksi embrio secara *in vitro*. hMG terdiri dari kombinasi hormon FSH dan LH.

Reseptor FSH di ovarium ada pada sel granulosa yang berperan langsung pada perkembangan folikel saat maturasi oosit (Simoni *et al.*, 1997). Reseptor LH lebih banyak di sel theca ovarium, yang berperan langsung pada proses *steroidogenesis* (Khas and Menon, 1998). Maturasi sel telur di luar tubuh (IVM) tidak akan berhasil dengan sempurna apabila tidak diciptakan kondisi yang serupa dengan di dalam tubuh induknya (*In Vivo*). Maturasi oosit maupun pertumbuhan embrio secara *In Vitro* diperlukan medium yang berfungsi sebagai tempat persediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit nutrisi. Zat-zat ada dalam medium merupakan zat - zat yang terlarut contohnya gula, asam amino dan ion organik yang diperlukan untuk metabolisme sel (Mahaputra dkk., 1999). Pada proses IVM dibutuhkan pula penambahan hormon FSH dan LH. Sebelum dilakukan IVM dan IVF pada manusia, pemberian terapi *hMG* ataupun *rFSH* pada resepien menunjukkan kemampuan yang sama jika diaplikasikan hingga tingkat *Intra Cytoplasmic Injection* (ICI) (Jacob *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 1999). Pemberian FSH-LH dengan komposisi yang seimbang dalam *in vitro* fertilisasi pada ternak ruminansia memberikan hasil yang sangat baik. Dosis FSH dan LH yang diberikan, masing-masing adalah 10 µg/ml (Martino *et al.*, 1994; Goto and Iritani, 1992; Sirard and Lambert, 1985).

1.2. Rumusan Masalah Penelitian Tahap I

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut :

Apakah *hMG* hasil penelitian hibah bersaing 2008 dapat digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *invitro*

1.2. Rumusan Masalah Penelitian Tahap II

- a. Apakah hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 berpengaruh terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

1.3. TUJUAN KHUSUS

Penelitian ini dirancang dengan tujuan jangka pendek dan jangka panjang sebagai berikut :

1.3.1. Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah.

- a. Menguji potensi biologis hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap pertumbuhan dan perkembangan embrio sapi secara *invitro*
- b. Menguji potensi biologis hMG hasil penelitian hibah bersaing 2008 terhadap perkembangan dan pertumbuhan folikel dan ovarium pada sapi perah penderita hypofungsi dengan pantauan USG.

1.3.2. Tujuan Jangka Panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah :

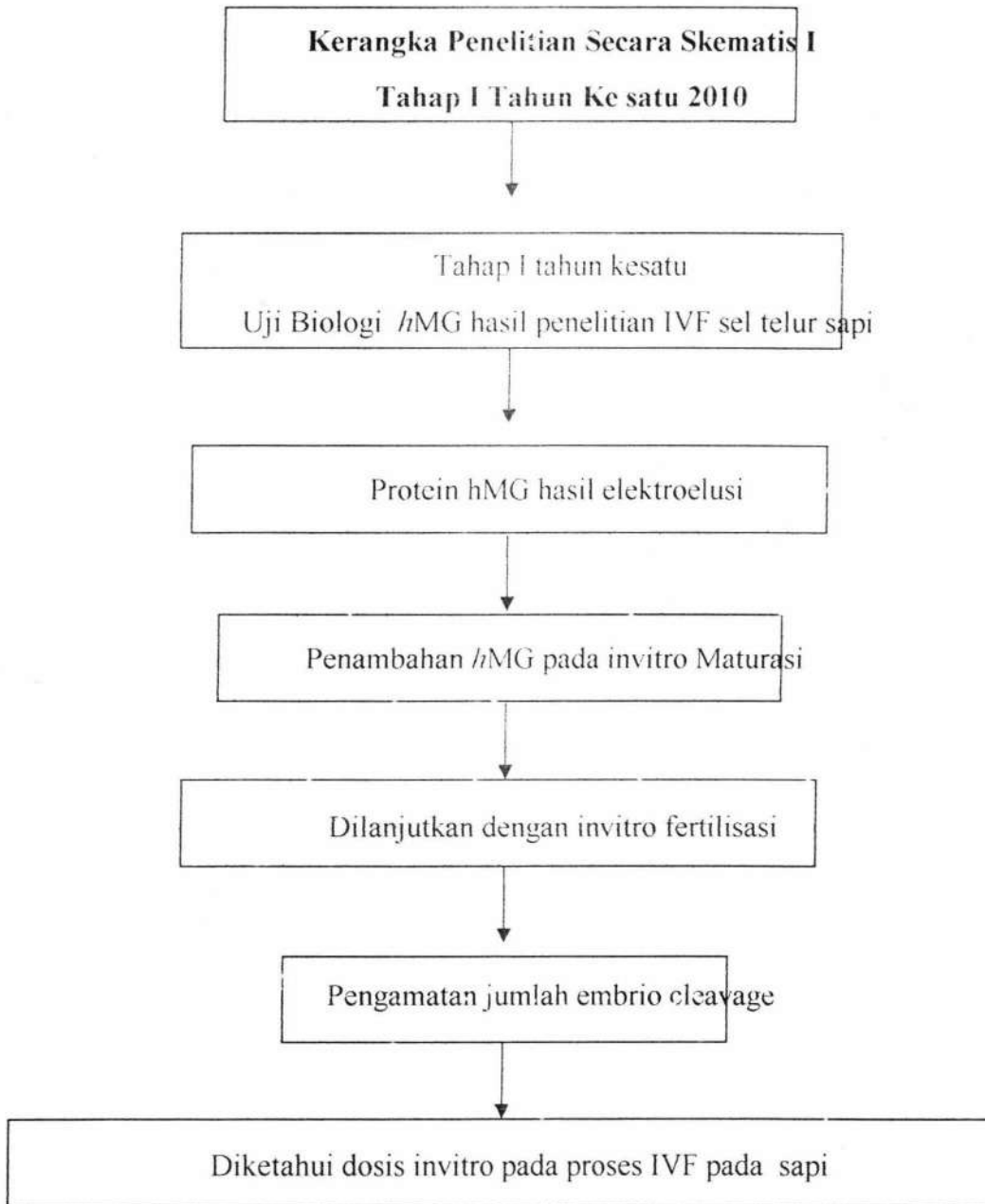
Menentukan suatu model teknologi penanganan infertilitas dan induksi birahi dengan hMG pada hewan coba lainnya dan ternak komersial pada khususnya.

II. Inovasi Penelitian

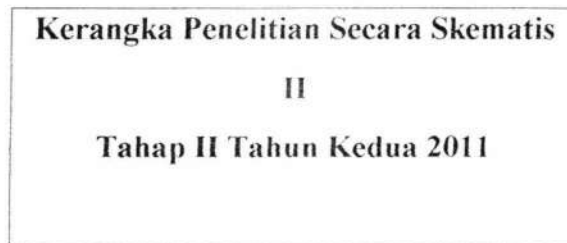
Produksi hMG dari urine perempuan menopause di Indonesia sebagai sumber FSH – LH like yang sangat dibutuhkan untuk tujuan fertilisasi invitro dan penanganan masalah infertilitas pada sapi khususnya hypofungsi ovarium sebagai pengganti PMSG (Pregnant Mare serum Gonadotropin) yang harganya sangat murah dibandingkan dengan produk dari luar negeri yang selama ini sulit dijumpai dipasaran di Indonesia.

2.1. Metode Penelitian

Digambarkan dalam kerangka penelitian secara skematis tiga tahap dari tahun 2010 s/d 2011 adalah sebagai berikut :



Digambarkan dalam kerangka penelitian secara skematis tiga tahap dari tahun 2011 adalah sebagai berikut :



**Uji coba dosis hMG untuk terapi hypofungsi ovarium sebelum
perlakuan hewan coba sapi perah diberikan perbaikan mutu pakan
selama 1 bulan**

Pemilihan Sapi dengan BCS
2

**Pemeriksaan Kondisi Ovarium dengan USG sebelum dan sesudah
perlakuan**

2.2. Jadwal Kerja Penelitian**Tahun Pertama 2010**

No	Kegiatan	Bulan				
		Juni	Juli	Agust.	Septb.	Okt.
1	Persiapan bahan dan alat penelitian	X				
2	Ekstraksi urine hMG	X	X			
3	Perlakuan SDS – PAGE		X	X	X	
4	Pemeriksaan berat molekul hMG		X	X	X	
5	Purifikasi hMG elektroelusi		X	X	X	
6	Uji Biologis hMG pada IVF sapi		X	X	X	
7	Analisis Data				X	X
8	Seminar Pelaporan					X

Tahun Kedua 2011

No	Kegiatan	Bulan				
		Juni	Juli	Agust.	Septb.	Okt.
1	Persiapan ekstraksi hMG Sephadex	X				
2	Persiapan pemilihan sapi perah	X	X			
3	Penjadwalan penyuntikan hMG		X	X	X	
4	Ujicoba Lapangan Injeksi hMG		X	X	X	
5	Pengamatan Birahi + IB + USG		X	X	X	
6	Pencatatan data hsl penelitian				X	
7	Analisis Data				X	X
8	Seminar Pelaporan					X

III. Kontribusi Terhadap Pembangunan

Upaya meningkatkan mutu genetik dan productivitas ternak, pemerintah telah memilih bioteknologi untuk mencapai tujuan tersebut, hal ini didukung dengan keluarnya keputusan menteri riset dan teknologi atau ketua BPPT No. 542 / KPIM/ VII/ 1992 yang menetapkan program unggulan bidang bioteknologi peternakan yang meliputi :

- (1) Meningkatkan mutu genetik ternak dengan prioritas pada sapi perah.
- (2) Peningkatan kemampuan reproduksi dan populasi ternak secara cepat dengan prioritas pada sapi perah dalam kaitannya memproduksi hormon sendiri terutama hMG sebagai FSH – LH like untuk infertilitas pada ternak khususnya sapi.
- (3) Koordinasi produksi bahan biologi dan diagnosa dini penyakit ternak.

IV. Manfaat Bagi Institusi

Penelitian ini telah melibatkan mahasiswa S1 sebanyak 5 orang untuk 5 judul skripsi .

V. Publikasi Ilmiah yang Direncanakan

Telah dikirimkan kemajalah journal Internasional Pertanika dengan *editor Prof. Jamri Asad DVM Phd. Dari University Putra Malaysia (UPM) Serdang Selangor. Dijadwalkan publikai awal tahun 2011.*



**DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN DAN
PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066

E-mail : infolemlit@unair.ac.id – <http://lppm.unair.ac.id>

**HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN HIBAH DP2M TAHUN 2010**

1. Judul Penelitian : **Aplikasi *human Menopause Gonadotropin (hMG)* Hasil Isolasi (hibah bersaing 2008) untuk *in vitro* Fertilisasi dan Memanipulasi Pertumbuhan Folikel Sapi Perah Penderita Hypofungsi Ovarium.**
2. Kepala Proyek Penelitian
 - a. Nama lengkap dan gelar : Herry Agoes Hermadi, drh, Msi
 - b. Jenis Kelamin : Laki-laki
 - c. Pangkat / Golongan / NIP : IV b/ 131690437
 - d. Jabatan Sekarang : LEKTOR
 - e. Jabatan Struktural : -
 - f. Bidang Ilmu yang diteliti : Biologi Molekuler reproduksi
 - g. Fakultas / Puslit / Jurusan : Kedokteran Hewan
 - h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 - i. Tim Peneliti

N	Nama	Bidang Ahli	Fakultas	PerguruanTinggi
1	Dr.Herry Agoes Hermadi Drh MSi	Bio Mol Reproduksi	FKH	Univ. Airlangga
2	Prof Masud Hariadi Phd Mphil Drh	Hormonal	FKH	Univ. Airlangga
3	Prof Dr Wurlina MS Drh	Kemajiran	FKH	Univ. Airlangga

3. Pendanaan dan Jangka waktu Penelitian
 - a. Jangka waktu penelitian : 7 bulan
 - b. Biaya yang diperlukan : Rp. 32.500.000,-
 - c. Biaya yang disetujui : Rp. 32.500.000,-

Surabaya, 26 Oktober 2010

Ketua Peneliti,

Herry Agoes Hermadi, drh, Msi
Nip.131690437

Mengetahui
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga

Prof. H. Romziah Sidik, PhD. Drh
Nip. 130687305



Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian
Kepada Masyarakat Unair

Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt., MSi
NIP. 195908051987011001