

**PENGARUH PEMBERIAN *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I)*  
DARI SERUM KUDA *CROSSBREED* BUNTING TERHADAP  
FOLIKULOGENESIS MENCIT (*Mus musculus*)**

**EFFECT OF *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I)* DERIVED FROM  
PREGNANT *CROSSBREED* MARE SERUM IN MICE (*Mus musculus*)  
FOLLICULOGENESIS**

**Abdullah<sup>1)</sup>, Tjuk Imam Restiadi<sup>2)</sup>, Nunuk Dyah Retno Lastuti<sup>3)</sup>, Tita Damayanti<sup>4)</sup>,  
Wurlina<sup>5)</sup>, Erma Safitri<sup>6)</sup>**

<sup>1)</sup>Student, <sup>2,4,5,6)</sup>Veterinary Reproduction Department <sup>3)</sup>Veterinary Parasitology Department  
Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University  
email: doellahlah@gmail.com

**ABSTRACT**

The purpose of the research was to know the effect of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) derived from pregnant crossbreed mare serum (PMS) in mice (*Mus musculus*) folliculogenesis. The subject of this research were 20 female mice. The research was arranged by Completely Randomized Design (CRD) with four treatments and five replications. The treatment were K0 = 10 ng/ml of physiological NaCl, P1 = 10 ng/ml of IGF-I PMS, P2 = 20 ng/ml of IGF-I PMS, and P3 = 40 ng/ml of IGF-I PMS. Observed variables are number of primary, secondary, tertiary and de Graff follicles. During the treatment the estrus cycle was also observed. The data of follicles number were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA), followed by HSD (Honestly Significant Difference) test. The result showed that the addition of IGF-I PMS significantly affect ( $p < 0,05$ ) on increasing of the primary and secondary follicles number. The addition of IGF-I PMS 20 ng/ml and 40 ng/ml can increase the primary and secondary follicle significantly ( $p < 0,05$ ).

**Key words:** IGF-I, IGF-I pregnant crossbreed mare serum, Folliculogenesis, *Mus musculus*

**Pendahuluan**

Kebutuhan manusia akan protein hewani dari tahun ke tahun terus bertambah, tercatat di Indonesia terjadi peningkatan konsumsi daging sebesar 6,65% dari tahun 2013 hingga 2014 (Direktorat Jenderal Peternakan dan Kesehatan Hewan, 2015) dan diperkirakan setiap tahunnya akan terus bertambah. Menurut data Badan Pusat Statistik setiap tahunnya terjadi penurunan jumlah perusahaan peternakan. Pada tahun 2011 hingga 2014 terjadi penurunan yang signifikan terhadap ternak sapi yang dipotong di RPH (Rumah Potong Hewan). Hal ini membuat kekurangan suplai daging di pasar. Banyak upaya yang telah dilakukan oleh pemerintah untuk mengatasi masalah ini, salah satunya dengan impor daging sapi dari Australia namun, ini juga masih belum mengatasi sepenuhnya karena harga daging impor tetap lebih mahal dibandingkan dengan daging lokal dan tidak mungkin terus menerus bergantung pada impor daging

saja. Sehingga memunculkan upaya untuk meningkatkan populasi dan produktivitas dari ternak.

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian (Permentan) no. 48 tahun 2016 tentang Upaya Khusus Percepatan Peningkatan Populasi Sapi dan Kerbau Bunting, Pasal 5 ayat 1 dan 2, upaya khusus percepatan peningkatan populasi sapi dan kerbau bunting dilakukan melalui sistem manajemen reproduksi. Sistem manajemen reproduksi meliputi pemeriksaan status reproduksi dan gangguan reproduksi, pelayanan Inseminasi Buatan (IB) dan kawin alam, pemenuhan semen beku dan N<sub>2</sub> cair, pengendalian betina produktif, dan pemenuhan hijauan pakan ternak dan konsentrat. Upaya untuk meningkatkan populasi dan produktivitas ternak ini, peternak sering mengalami kendala terutama masalah reproduksi. Masalah reproduksi yang biasa terjadi pada sapi induk antara lain, ternak bunting tetapi tidak menunjukkan tanda

berahi, kelainan hormon reproduksi (progesteron tinggi) sehingga menyebabkan terjadinya bunting semu dan kista luteal, keluarnya leleran berwarna putih, kekuningan atau kehijauan yang berbau tidak sedap karena peradangan pada saluran reproduksi, tanda berahi yang tidak teramati peternak, kekurangan pakan sehingga menyebabkan hipofungsi ovarium, kawin berulang, dan kelainan hormon reproduksi (estrogen tinggi) yang dapat disebabkan oleh kista folikel (Ulum dan Purwantara, 2015)

Menurut Ismudiono, dkk. (2010) reproduksi atau perkembangbiakan merupakan proses pembentukan individu baru, dalam hal ini melalui proses perkawinan baik alami maupun buatan. Menurut Nursyah (2012) reproduksi adalah proses fisiologis pada seluruh makhluk hidup untuk mempertahankan keturunan dan kelangsungan hidup. Proses ini memerlukan kerja hormon reproduksi yaitu hormon yang secara langsung atau tidak langsung berpartisipasi dalam proses reproduksi. Ovarium merupakan organ reproduksi yang memiliki peran yang sangat penting. Ovarium memiliki dua fungsi dasar yaitu memproduksi oosit yang *fertilizable* dan memiliki perkembangan yang sempurna, serta untuk mensekresi hormon steroid yang diperlukan untuk mempersiapkan saluran reproduksi dalam proses fertilisasi dan implantasi (Palermo, 2007) sehingga ketika ovarium mengalami gangguan maka dapat mengganggu sistem reproduksi. Banyak penelitian yang menggunakan bahan bioaktif yang bertujuan untuk meningkatkan kemampuan reproduksi.

Salah satu bahan bioaktif yang berperan dalam sistem reproduksi hewan betina adalah *Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I)*. Suplementasi *IGF-I* dalam medium maturasi dan kultur oosit dapat menstimulasi dan meningkatkan jumlah oosit yang matang, meningkatkan hasil *in vitro fertilization (IVF)* (Oberlender *et al.*, 2013), dan jumlah embrio yang mencapai tahap blastosis pada beberapa jenis ternak termasuk diantaranya babi dan sapi (Neira *et al.*, 2010), serta kerbau (Singhal *et al.*, 2009). Magalhaes-Padilha *et al.* (2012) melaporkan bahwa penambahan *IGF-I* selama kultur folikel preantral babi dapat meningkatkan diameter folikel, meningkatkan eks-

presi mRNA *Insulin-Like Growth Factor Receptor-I (IGFR-I)* dengan suplementasi *Follicle Stimulating Hormone (FSH)* selama kultur dan oosit yang dihasilkan dapat memulai proses meiosis setelah maturasi. Begitu juga menurut Silva *et al.* (2009) bahwa *IGF* dapat meningkatkan proliferasi sel-sel granulosa, steroidogenesis dan pertumbuhan oosit pada sebagian besar spesies mamalia. Selain itu penelitian yang dilakukan Echterkamp *et al.* (1990) memberikan bukti yang menunjukkan bahwa kejadian kembar pada sapi dikaitkan dengan peningkatan konsentrasi *IGF-I* pada serum maupun cairan folikel. *IGF-I* dari ovarium dan (atau) yang berasal dari sirkulasi sistemik, memainkan peran dalam regulasi folikulogenesis dan merupakan mediator dari komponen genetik dari beberapa ovulasi pada sapi.

#### **Materi dan Metode Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit betina galur Balb/C umur 28-32 hari yang diperoleh dari Pusat Veterineria Farma, Surabaya dan telah dinyatakan laik etik oleh Komisi Etik Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Mencit yang digunakan sebanyak 20 ekor dimana masing-masing dikelompokkan dalam 4 kelompok perlakuan. Kelompok kontrol (K0) diinjeksi dengan NaCl fisiologis sebanyak 0,1 ml, kelompok perlakuan (P1) diinjeksi dengan *IGF-I* SKB dosis 10 ng/ml sebanyak 0,1 ml, kelompok perlakuan (P2) diinjeksi dengan *IGF-I* SKB dosis 20 ng/ml sebanyak 0,1 ml, dan kelompok perlakuan (P3) diinjeksi dengan *IGF-I* SKB dosis 40 ng/ml sebanyak 0,1 ml. Semua penyuntikkan dilakukan secara subkutan. Penyuntikkan *IGF-I* SKB dilakukan sebanyak 5 kali dalam kurun waktu 5 hari. Sebelum melakukan penyuntikkan semua mencit dilakukan pengambilan ulas vagina untuk mengetahui status reproduksinya.

#### **Pembedahan Hewan Coba dan Pembuatan Sediaan Histopatologi Ovarium Mencit**

Pada akhir penelitian hewan coba dikorbankan dengan cara dianastesi dengan eter hingga mati dan kemudian dilakukan

pembedahan untuk mengambil ovarium kirinya. Setelah diambil, ovarium kiri dipisahkan dari jaringan lemaknya dan dimasukkan dalam formalin 10% untuk memfiksasi jaringan. Setelah 1-2 hari terfiksasi, ovarium kiri masuk ke tahap selanjutnya untuk pembuatan preparat histopatologi ovarium mencit. Pembuatan preparat histopatologi ovarium mencit dilakukan dengan teknik rutin pewarnaan *Haematoxylin-Eosin* di Laboratorium Patologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

### Identifikasi dan Penghitungan Folikel Ovarium Mencit

Preparat ovarium yang telah jadi diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran lensa okuler 10x serta lensa objektif yang bervariasi mulai perbesaran 4x-40x. Klasifikasi folikel didasarkan pada ukuran oosit pada folikel dari masing-masing tahap perkembangan, pada ukuran folikel ditentukan oleh jumlah sel yang menyelimuti folikel, dan morfologi folikel (Pedersen and Peters, 1968). Folikel primer terdiri dari satu lapisan sel granulosa pipih dan kubis atau hanya kubis saja, folikel sekunder terdiri dari dua atau lebih lapisan sel granulosa kubis (Gougeon *et al.* 1996), folikel antral kecil (folikel tersier) memiliki rongga tersegmentasi dengan dua atau lebih antrum, dan folikel antral besar (folikel de Graff) memiliki satu rongga yang disebut antrum yang terus menerus membesar (Griffin *et al.* 2006). Penghitungan jenis folikel (baik preantral dan antral) pada ovarium dihitung dengan cara memeriksa seluruh lapang pandang. Kemudian data dikumpulkan dan dianalisis.

### Analisis Data

Data jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graff setelah diberi perlakuan *IGF-I* SKB dianalisa dengan menggunakan Uji ANOVA (*Analysis of Variance*). Apabila terdapat beda nyata ( $p < 0,05$ ), maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Jujur (BNJ) (Kusningrum, 2011). Adapun analisa dan pengolahan data untuk penelitian ini menggunakan program statistik komputer dengan menggunakan software SPSS 20 (*Statistical Product and Service Solution 20*).

### Hasil dan Pembahasan

#### Hasil Identifikasi dan Penghitungan Jumlah Folikel Ovarium Mencit (*Mus musculus*) Perlakuan *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* Serum Kuda *Crossbreed* Bunting

Hasil penghitungan jumlah folikel primer ovarium mencit setelah diberi *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* Serum Kuda *Crossbreed* Bunting (SKB) menunjukkan adanya peningkatan jumlah folikel primer pada ovarium mencit (*Mus musculus*). Pemberian *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* serum kuda *crossbreed* bunting menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) pada jumlah folikel primer mencit (*Mus musculus*) pada perlakuan P1, P2, dan P3. Dosis *IGF-I* SKB 20 ng/ml dan 40 ng/ml (P2 dan P3) dapat meningkatkan jumlah folikel primer ovarium mencit (*Mus musculus*) ( $P < 0,05$ ).

Hasil penghitungan jumlah folikel sekunder ovarium mencit (*Mus musculus*) setelah diinjeksi *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda *crossbreed* bunting (SKB) menunjukkan adanya perubahan. Pemberian *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda *crossbreed* bunting menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap jumlah folikel sekunder ovarium mencit (*Mus musculus*) pada perlakuan P1, P2, dan P3. Dosis *IGF-I* SKB 20 ng/ml dan 40 ng/ml (P2 dan P3) dapat meningkatkan jumlah folikel sekunder ovarium mencit (*Mus musculus*) dibandingkan dengan kelompok kontrol (K0) ( $P < 0,05$ ). Selain itu, Dosis *IGF-I* SKB 20 ng/ml dan 40 ng/ml (P2 dan P3) juga berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kelompok P1 dalam meningkatkan jumlah folikel sekunder ovarium mencit (*Mus musculus*).

Hasil penghitungan jumlah folikel tersier dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*) setelah diinjeksi *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda *crossbreed* bunting (SKB) tidak menunjukkan adanya perubahan. Pemberian *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda *crossbreed* bunting tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap jumlah folikel tersier dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*) pada perlakuan P1, P2, dan P3.

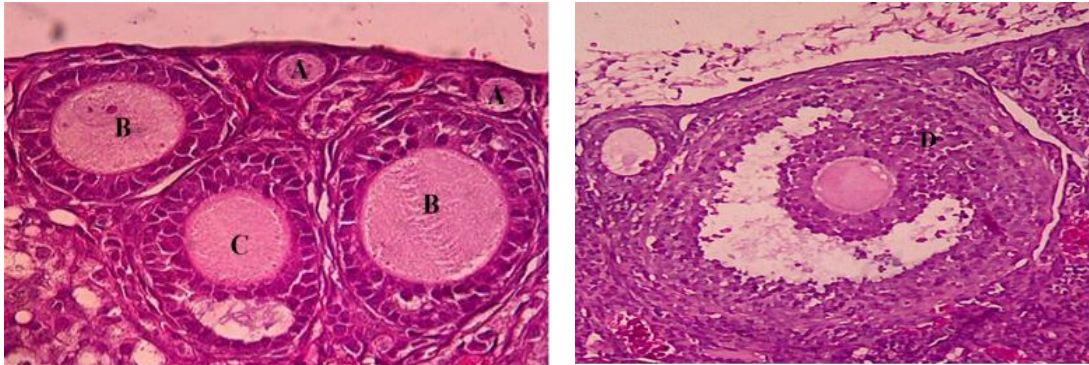
Gambar masing-masing folikel terdapat pada Gambar 1. Data hasil penghitungan

jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*) setelah diinjeksi IGF-I SKB disajikan dalam Tabel 1, sedangkan grafik jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*)

setelah diinjeksi IGF-I SKB dapat dilihat pada Gambar 2.

**Pembahasan**

Ovarium sangat penting untuk mensuplai sel-sel germinal yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidup suatu spesies dan juga



Gambar 1. Hasil identifikasi folikel ovarium mencit (*Mus musculus*). (A) Folikel primer, (B) Folikel sekunder, (C) folikel tersier (*Haematoxylin-Eosin*, 400x) dan (D) folikel de Graff (*Haematoxylin-Eosin*, 100x).

Tabel 1. Rerata dan simpangan baku jumlah folikel primer, sekunder, tersier, dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*) setelah diberi perlakuan IGF-I SKB

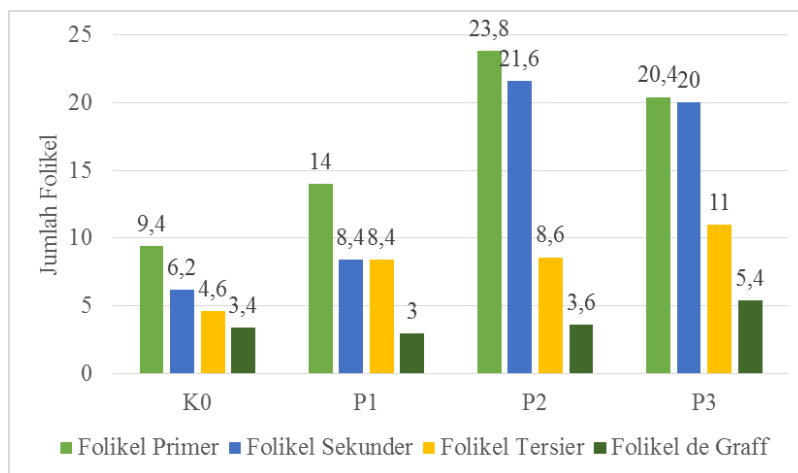
Perlakuan	Jumlah Folikel ( $\bar{x} \pm SD$ )			
	Folikel Primer	Folikel Sekunder	Folikel Tersier	Folikel de Graff
K0	9,40 <sup>a</sup> ± 6,58	6,20 <sup>a</sup> ± 3,11	4,60 <sup>a</sup> ± 2,88	3,40 <sup>a</sup> ± 2,79
P1	14,00 <sup>ab</sup> ± 2,82	8,40 <sup>a</sup> ± 2,88	8,40 <sup>a</sup> ± 2,88	3,00 <sup>a</sup> ± 1,22
P2	23,80 <sup>b</sup> ± 7,19	21,60 <sup>b</sup> ± 6,34	8,60 <sup>a</sup> ± 4,27	3,60 <sup>a</sup> ± 1,14
P3	20,40 <sup>b</sup> ± 4,87	20,00 <sup>b</sup> ± 10,12	11,0 <sup>a</sup> ± 4,41	5,40 <sup>a</sup> ± 1,81

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p < 0,05$ )

P1 = diinjeksi 10 ng/ml IGF-I SKB

P2 = diinjeksi 20 ng/ml IGF-I SKB

P3 = diinjeksi 40 ng/ml IGF-I SKB



Gambar 2. Grafik rerata jumlah folikel primer, sekunder, tersier dan de Graff ovarium mencit (*Mus musculus*) setelah diberi perlakuan IGF-I SKB

berfungsi menghasilkan hormon-hormon yang berguna bagi pertumbuhan dan perkembangan individu betina (Hoyer, 2004., Bhattacharya and Keating, 2012., Anderson and Hirshfield, 1992). Betina dilahirkan dengan jumlah folikel primordial yang terbatas yang nantinya akan habis dan tidak dapat bertambah lagi. Hal ini lah yang menyebabkan folikulogenesis disebut sebagai proses yang irreversibel (Edson *et al.* 2009., Hirshfield, 1991., dan Elvin and Matzuk, 1998). Folikulogenesis ovarium terdiri dari semua proses pertumbuhan folikel, diferensiasi, serta ovulasi dan lebih dari 99% folikel yang dihasilkan oleh ovarium akan berdegenerasi atau mengalami atresia. Pada mamalia, pertumbuhan folikel diatur oleh faktor endokrin seperti *FSH* dan *LH* serta faktor parakrin. Diantara faktor tersebut, suatu elemen yang disebut sistem *Insulin-like Growth Factor (IGF)* memainkan peran penting dalam memodulasi aktifitas gonadotropin dalam proliferasi dan diferensiasi sel-sel folikuler (Monget *et al.* 1996).

Berdasarkan hasil penelitian ini, pemberian Insulin-like Growth Factor-I (*IGF-I*) dari serum kuda crossbreed bunting dapat menambah jumlah folikel primer dan sekunder secara nyata ( $P < 0,05$ ) yang dibandingkan dengan kontrol. Jumlah folikel tersier dan de Graff dari mencit (*Mus musculus*) yang diinjeksi dengan *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) dengan kelompok kontrol (K0). Dosis *IGF-I* 20 ng/ml dan 40 ng/ml dapat meningkatkan jumlah folikel primer dan sekunder secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dibandingkan kelompok kontrol (K0). Hal ini membuktikan bahwa fungsi *IGF-I* pada sel-sel folikel yang dapat merangsang sel-sel reseptor tipe I pada sel-sel granulosa dan sel-sel teka (Giudice, 1992) dan ekspresi reseptor tersebut pada sel-sel granulosa ditingkatkan oleh adanya estrogen dan gonadotropin. Sedangkan ekspresi reseptor *IGF-I* dapat meningkat pada folikel antral kecil (Wandji *et al.*, 1992).

Dari hasil penelitian ini *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda crossbreed bunting dapat meningkatkan jumlah folikel primer dan sekunder karena mencit yang digunakan belum memasuki pubertas. Hal ini sesuai dengan teori perkembangan folikel yang dikemukakan oleh

Partodihardjo (1992) dimana pada mencit umur pra pubertas seperti yang digunakan pada penelitian ini dalam ovarium mencit yang dominan adalah perkembangan folikel primer dan sekunder.

Terdapat pula teori yang menyatakan bahwa perkembangan folikel ovarium dibagi menjadi dua tahapan yaitu fase preantral dan antral. Fase preantral meliputi folikel primordial, folikel primer dan folikel sekunder. Fase preantral atau *gonadotropin-independent phase* ditandai dengan pertumbuhan dan diferensiasi oosit yang dipengaruhi oleh faktor-faktor pertumbuhan melalui sistem autokrin/parakrin, seperti *Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily* dan *Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)*. Fase antral atau fase *gonadotropin-dependent* ditandai dengan peningkatan pesat dari ukuran folikel itu. Fase antral meliputi folikel de graff. Fase antral diatur oleh *Follicle Stimulating Hormone (FSH)* dan *Luteinizing Hormone (LH)* serta faktor-faktor pertumbuhan lainnya. Faktor-faktor pertumbuhan ini akan merangsang proliferasi sel dan mempengaruhi aktivitas gonadotropin (Webb *et al.*, 2004; Anwar, 2005; Gannon, 2013). Oleh karena itu, pada penelitian ini hanya folikel primer dan sekunder saja lah yang mengalami peningkatan jumlah yang signifikan sedangkan folikel tersier dan de Graff mengalami penambahan ukuran.

Mekanisme kerja kompleks protein *IGF-I* dan *IGFBP-3* pada folikel *immature* dan *mature* dijelaskan dalam Roche (1998) bahwa pada folikel *immature*, *LH* akan merangsang sel teka untuk membentuk androgen dengan dibantu oleh *IGF-1* dan aktivin yang berada di sel granulosa. *IGF-1* akan berikatan *IGFBP-3* kemudian dipecah dengan *TIMP (Tissue Inhibiting Metallo Proteinase)* yang tinggi tetapi kemampuan memecahnya tidak terlalu besar sehingga *IGF-1* dihasilkan tidak banyak. Androgen dibawa ke sel granulosa kemudian diubah menjadi estradiol melalui proses aromatisasi dan dirangsang oleh *IGF-1* dan *FSH*.

Pada folikel *mature*, *LH* akan merangsang sel teka untuk membentuk androgen dibantu oleh *IGF-1* dan Inhibin yang berada di sel granulosa. *IGFBP-3* akan dipecah oleh *TIMP* menghasilkan *IGF-I* dalam jumlah banyak. Androgen dibawa ke sel granulosa dan diubah menjadi estradiol

melalui proses aromatisasi, dikontrol oleh enzim aromatase inhibitor yang dihasilkan oleh sel granulosa, kemudian dirangsang oleh *IGF-I* dan *FSH* sehingga sekresi estradiol meningkat (Roche, 1998). Hal inilah yang membuat dalam pemeriksaan siklus estrus mencit yang digunakan yang mula-mula belum memasuki fase estrus akan memasuki fase estrus lebih cepat dan terus dipertahankan selama masa penyuntikan *IGF-I*.

Komplek protein *IGF-I* dan *IGFBP-3* berpengaruh terhadap pembentukan *FSH*, dan hormon *FSH* tersebut yang dihasilkan oleh hipofisa anterior akan berperan merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium dan juga akan merangsang pembentukan reseptor *LH* pada sel-sel folikel ovarium (Peters, 1985). Menurut Rochler (1993) penyuntikan kompleks protein *IGF-I* dan *IGFBP-3* pada fase diestrus dapat merangsang hipofisa anterior untuk menghasilkan *LH* dan *FSH* yang mensekresikan hormon estrogen dalam darah. Peningkatan sekresi estradiol oleh sel-sel folikel dominan saat ovulasi akan menyebabkan birahi dan merangsang banjir *LH* serta pengeluaran ovum.

### Kesimpulan

Pemberian *Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I)* dari serum kuda *crossbreed* bunting (SKB) dapat meningkatkan jumlah folikel primer dan sekunder. Dosis *IGF-I* SKB 20 ng/ml dan 40 ng/ml dapat meningkatkan jumlah folikel primer dan sekunder. Tidak ada dosis *IGF-I* SKB yang dapat meningkatkan jumlah folikel tersier dan de Graff.

### Daftar Pustaka

- Anderson, L D. and Hirshfield, A N. 1992. An overview of follicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum in vitro. *Md Med J.* 41: 614–620.
- Anwar, R. 2005. Morfologi dan Fungsi Ovaarium. Subbagian Fertilitas dan Endokrinologi Reproduksi Bagian Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Unpad.
- Bhattacharya, P and Keating, A F. 2012. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*; 261: 227–235.
- BPS. 2015. Peternakan. Badan Pusat Statistik Nasional.
- Direktorat Jendral Peternakan dan Kesehatan Hewan. 2015. Statistik Peternakan dan Kesehatan Hewan 2015. Kementerian Pertanian.
- Echternkamp, SE., Spicer, LJ., Gregory, KE., Canning, SF., Hammond, JM. 1990. Concentrations of insulin-like growth factor-I in blood and ovarian follicular fluid of cattle selected for twins. *Biol Reprod.* 43: 8–14.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 30: 624–712.
- Elvin, J A., Matzuk, M. M. 1998. Mouse models of ovarian failure. *Rev Reprod.* 3:183–195.
- Gannon, A.M. 2013. Exposure To Cigarette Smoke And Its Impact On The Ovarian Follicle Population Mechanisms Of Follicle Loss. Canada: McMaster University.
- Giudice, L.C. 1992. Insulin-like Growth Factor and Ovarian Follicular Development. *Endocrine Reviews.* 13: 641–669.
- Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17: 121–55.
- Griffin, J., Benjamin, R., Emery, B. R., Huang, I., Peterson, C. M., Carrell, D. T. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod.* 3:2.
- Hirshfield, A N. 1991 Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 124: 43–101.
- Hoyer, P B. 2004. Can the clock be turned back on ovarian aging?. *Sci Aging Knowl Environ* 2004. p:11.
- Ismudiono, Srianto, P., Anwar, H., Madyawati, S.P., Samik, A., dan Safitri, E. 2010. Buku Ajar Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Air-angga University Press. Surabaya.

- Kementerian Pertanian. 2016. Peraturan Menteri Pertanian (Permentan) no. 48 tahun 2016 tentang Upaya Khusus Percepatan Peningkatan Populasi Sapi dan Kerbau Bunting. Kementerian Pertanian Republik Indonesia.
- Kusriningrum, R.S. 2011. Perancangan Percobaan. Airlangga University Press. Surabaya. Hal : 165-212.
- Magalhaes-Padilha, D.M., Duarte, A.B.G., Araujo, V.R., Saraiva, M.V.A., Almeida, A.P., Rodrigues, G.Q., Matos, M.H.T., Campello, C.C., Silva, J.R. and M.O. Gastal. 2012. Steady-state Level of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) Receptor mRNA and The Effect of IGF-I on the In Vitro Culture of Caprine Preantral Follicles. *Theriogenology* 77: 206–213.
- Monget, P., Besnard, N., Huet, C., Pisselet, C., Monniaux, D. 1996. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm Res* 45: 211–217.
- Neira, J.A., Tainturier, D., Pen, M.A. and J. Martal. 2010. Effect of the Association of IGF- I, IGF-II, bFGF, TGF- $\beta$ 1, GM-CSF, and LIF on the Development of Bovine Embryos Produced In Vitro. *Theriogenology* . 73: 595–604.
- Nursyah, D.A. 2012. Gambaran Siklus Estrus Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Ovariektomi Yang Diberi Tepung Daging Teripang (*Holothuria scabra*) [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Oberlender, G., Murgas, L.D.S., Zangeronimo, M.G., da Silva, A.C., Menezes, T.A., Pontelo, T.P. and L.A. Vieira. 2013. Role of Insulin-Like Growth Factor-I and Follicular Fluid from Ovarian Follicles with Different Diameters on Porcine Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Theriogenology*. 80: 319–327.
- Palermo, R. 2007. Differential Actions of FSH and LH During Folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine* 15(3): 326-337.
- Partodiharjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Ed. Ke-3. Jakarta: Mutiara Sumber Widya.
- Pedersen T, and Peters H. 1968. Proposal For A Classification of Oocytes and Follicles in The Mouse Ovary. *J Reprod Fertil*. 17: 555–557.
- Peters, A. R. 1985. Hormonal Control of Bovine Oestrous Cycle 1. The Natural Cycle. *Br. Vet. J. Reprod. Fertil*. 14: 546-573
- Roche, J. F. 1998. Controls of Folliculogenesis. *J Theriology*. 49: 457-467
- Rochler, M. M. 1993. Insulin-like Growth Factor Binding Protein, Vitamins and Hormone. *J. Reprod. Fertil*. 47: 1-114
- Silva, J. R. V., Figueiredo, J. R., van den Hurk, R. 2009. Involvement of Growth Hormone (GH) and Insulin-Like Growth Hormone (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* 71: 1193–1208.
- Singhal, S., Prasad, S., Singh, B., Prasad, J.K. and H.P. Gupta. 2009. Effect of Including Growth Factors and Antioxidants in Maturation Medium Used for In Vitro Culture of Buffalo Oocytes Recovered In Vivo. *Anim Reprod Sci*. 113:44– 50.
- Ulum, F. M. dan Purwanta, B. 2015. Manual : Manajemen Kesehatan Reproduksi Ternak Sapi. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wandji, S.A., Teresa, L.W., Jennifer, C., Steven, W.L. and J.M. Hammond. 1998. Expression of Mouse Ovarian Insulin-like Growth Factor System Component During Follicle Development and Atresia. *Endocrinology*. 134: 5205-5214.
- Webb, R., Garnsworthy, PC., Gong, JG., and Armstrong, DG. 2004. Control of Follicular Growth: Local Interaction and Nutritional Influence. *Journal of Animal Science*. 82 : E63-E74.