

Original article

Pengaruh urea dalam media maturasi *in vitro* terhadap tingkat maturasi oosit sapi

The effect of urea in *in vitro* maturation medium on maturation rate of bovine oocyte

Sepvian Dewi Kurniawati^{1*}, Suryanie Sarudji², Widjiati Widjiati³¹ Division of Veterinary Reproduction, ² Division of Veterinary Microbiology,³ Division of Veterinary Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Universitas Airlangga*Corresponding author, e-mail: sepvian.dewi.kurniawati-2019@fkh.unair.ac.idOpen access under CC BY – SA license, DOI: [10.20473/ovz.v10i2.2021.46-52](https://doi.org/10.20473/ovz.v10i2.2021.46-52)

Received June 27 2021, Revised July 21 2021, Accepted July 28 2021

Published online August 17 2021

ABSTRACT

This study was aimed to determine the effect of urea in maturation medium on *in vitro* oocyte maturation rate. The medium used was TCM-199 added with Hepes, NaHCO₃, Kanamycin 0.15 IU/mL, PMSG, 0.15 IU/mL hCG, and 10% FBS. Cumulus oocyte complexes (COCs) of cows derived from follicle aspiration were divided into three groups. In control group (P0), the COCs were matured *in vitro* in a maturation medium without urea addition, meanwhile in the P1 and P2 groups, the medium was added with urea 20 and 40 mg/dL, respectively. Each petri dish contained three drops of maturation medium (300 µl/drops) according to the groups. Microdrops were coated with mineral oil and then incubated in a 5% CO₂ incubator, at 39 °C with maximum humidity. Aceto-orcein staining was conducted to evaluate the maturation of oocytes based on the achievement of metaphase II phase that is indicated by the presence of metaphase plate and/or first polar body. The result showed that the oocyte maturation rates of P0, P1, and P2 were 51.25, 52.43 (p >0.05), and 46.88 % (p <0.05) respectively. It could be concluded that the presence of urea at 40 mg/dL in maturation medium reduced the percentage of bovine oocyte maturation *in vitro*.

Keywords: bovine oocyte, cumulus-oocyte complexes, *in vitro* maturation, TCM-199, urea

PENDAHULUAN

Peternak umumnya menambah jumlah pakan konsentrat pada sapi perahnya dengan tujuan meningkatkan produksi susu. Produk akhir metabolisme protein pada ternak ruminansia adalah urea yang kemudian beredar dalam aliran darah sebagai *blood urea nitrogen* (BUN) dan diekskresikan kedalam susu sebagai *milk urea nitrogen* (MUN) (Getahun *et al.*, 2019). Terdapat korelasi positif antara BUN dan MUN, dan konsentrasinya dalam tubuh sapi cenderung seimbang (Batista *et al.*, 2017). Urea dalam darah dan susu dipengaruhi oleh rasio

pemberian protein. Sapi perah FH yang mendapat asupan pakan dengan rasio konsentrat/rumput lebih dari 30% menunjukkan kadar MUN lebih tinggi, produksi susu dan performa reproduksi lebih baik dibandingkan dibandingkan sapi dengan rasio konsentrat/rumput kurang dari 30% (Utama *et al.*, 2018). Batas optimum MUN secara individual pada sapi berkisar antara 8-25 mg/dL, sedangkan konsentrasi optimum BUN berkisar antara 12-18 mg/dL (Bazet *et al.*, 2010). Oleh karena itu, pengukuran kadar MUN maupun BUN dapat dimanfaatkan sebagai informasi penting bagi peternak tentang status gizi dan kesehatan ternak

(Roy *et al.*, 2011). Kadar MUN 8 sampai 12 mg/dL adalah rentang optimum yang mencerminkan ransum yang diformulasikan untuk memenuhi kebutuhan protein sapi perah dengan produktivitas yang tinggi. Ransum tersebut disusun atas keseimbangan fraksi protein, dan karbohidrat untuk menangkap kelebihan amonia rumen, dengan kadar protein ransum sekitar 16%. Kadar MUN yang rendah menggambarkan kurang optimalnya pemanfaatan kapasitas produksi susu sapi perah, sedangkan kadar MUN yang tinggi menunjukkan penggunaan asupan nitrogen yang tidak efisien untuk produksi susu (Gullinński *et al.*, 2016; Lavery dan Ferris, 2021).

Protein pakan yang tinggi yang berasal dari konsentrat pada sapi perah dilaporkan terkait dengan penurunan tingkat konsepsi, pH uterus, fungsi ovarium dan peningkatan *services per conception* (Rodney *et al.*, 2018), sehingga justru dapat mengganggu kinerja reproduksi sapi perah (Fang *et al.*, 2019). Kelebihan protein dalam pakan diatas batas maksimum akan diikuti dengan peningkatan pembentukan urea dalam hati, peningkatan kadar urea dalam darah, perubahan komposisi cairan dalam uterus dan penurunan *conception rates* (Cheng *et al.*, 2015). Semua sapi FH dengan kadar BUN lebih dari 18 mg/dL tidak mengalami kesulitan untuk bunting (Putri *et al.*, 2018).

Terdapat korelasi positif yang kuat antara blood urea nitrogen (BUN) dan follicular fluid urea nitrogen (FUN). Kadar BUN dan FUN lebih tinggi pada kuda dengan folikel yang sedang tumbuh dibandingkan dengan folikel preovulasi. Kadar BUN lebih tinggi terdapat pada kuda donor yang menghasilkan embrio yang gagal menghasilkan kebuntingan dibandingkan dengan kuda donor dengan embrio yang menghasilkan kebuntingan (Boakari *et al.*, 2021). Sehubungan dengan hal itu, maka penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh urea dalam media maturasi *in vitro* terhadap penurunan persentase maturasi oosit sapi.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap terdiri atas tiga kelompok dengan yang masing-masing terdiri atas enam ulangan.

Sampel yang digunakan adalah oosit yang diperoleh dari ovarium sapi-sapi betina yang telah majir karena gangguan reproduksi pada uterusnya, yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, Surabaya. Sejumlah *cumulus oocyte complexes* (COCs) yang diperoleh dari setiap pengambilan ovarium dari RPH dibagi secara acak menjadi tiga kelompok. Pada kelompok kontrol (P0) COCs dimaturasi dalam media maturasi tanpa penambahan urea, sedangkan kelompok P1 dan P2 COCs dimaturasi dalam media maturasi dengan penambahan urea 20 dan 40 mg/dL.

Maturasi oosit secara *in vitro*, pewarnaan oosit, dan perhitungan tingkat maturasi oosit yang matur dilakukan di Sub Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* (Laboratorium Kebidanan) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Aspirasi oosit

Ovarium sapi dibawa dari RPH dalam termos *stainless*. Ovarium dipisahkan dari jaringan lain menggunakan gunting bengkok. Ovarium yang sudah terpisah dicuci tiga kali dengan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dengan suhu 39 °C. Cairan folikel diaspirasi dari folikel yang mempunyai ukuran 2-8 mm dengan menggunakan *syringe* 10 mL dan jarum 18 *gauge* yang berisi media *dissection* yang mengandung TCM-199, Hepes, dan Kanamycin monosulphate dengan pH 7,4, osmolaritas 279 mOsm/kg H₂O dan ditambah FBS 10% (Kartikasari *et al.*, 2020).

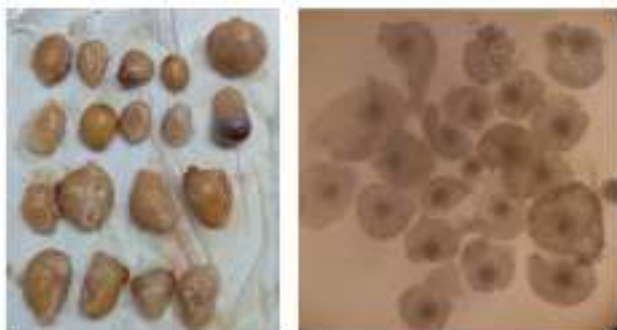
Cairan hasil aspirasi didiamkan selama 5 menit di dalam tabung untuk mengendapkan COC. Cairan hasil aspirasi diambil hingga tersisa sedikit diatas endapan COCs di bagian dasar tabung, endapan COC dan sisa cairan dalam tabung dituang pada *petri dish* 100 mm yang sudah diberi garis bantu. Seleksi oosit menggunakan mikroskop *dissecting* dengan perbesaran 100-200 x, dan dilakukan pencucian dan seleksi COCs yang mempunyai sitoplasma homogen serta masih mempunyai minimal tiga lapis sel cumulus yang padat. Hasil seleksi dipindahkan ke media *dissection* di *petri dish* 60 mm, lalu diseleksi kembali dan COCs dipindahkan ke media *dissection* di *petri dish* 35 mm (Kartikasari *et al.*, 2020).

Maturasi oosit *in vitro*

Cumulus oocyte complexes (COCs) yang sudah diseleksi dari media *dissection* dipindahkan ke dalam tetes (*drop*) media maturasi. Media maturasi yang digunakan adalah media TCM-199, dengan penambahan Sodium bicarbonate, Kanamycin monosulphate, dan HEPES dengan pH 7,8, osmolaritas 280 mOsm/kg H₂O dan ditambahkan FBS 10%, PMSG 0,15 IU/mL, hCG 0,15 IU/mL. Setiap *petridish* dibuat tiga *drop* media maturasi (300 µl/*drop*) yang dilapisi mineral oil kemudian telah diinkubasi minimal 2 jam sebelum maturasi pada inkubator CO₂ 5%, kelembaban maksimal, suhu 39°C selama 24 jam (Kartikasari et al., 2020).

Perwarnaan aceto-orcein

Sel kumulus yang mengelilingi oosit dihilangkan dengan cara dipipet berulang-ulang menggunakan mikropipet dalam media *dissection* yang mengandung hyaluronidase 100 IU/mL. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus difiksasi dengan cara oosit diletakkan di atas gelas obyek yang telah diberi campuran parafin wax dan vaselin (1:9) pada bagian samping tepi, kemudian ditutup dengan *cover glass*. *Cover glass* ditekan sedikit agar oosit agak terjepit sehingga tidak lepas pada saat fiksasi, pewarnaan dan pencucian. Setelah oosit terjepit gelas obyek dimasukkan ke dalam *staining jar* berisi larutan asam asetat-methanol (1:3) minimal selama 24 jam. Setelah difiksasi oosit diwarnai dengan aceto-orcein 1% dan dicuci dengan aceto-glycerol-aquades (1:1:3) (Kartikasari et al., 2020).



Gambar 1 Ovarium sapi setelah dibersihkan dari jaringan sekitarnya (kiri), dan *cumulus oocyte complex* sapi (kanan) diperiksa menggunakan mikroskop *Inverted Olympus* perbesaran 100x.

Pengamatan oosit matur

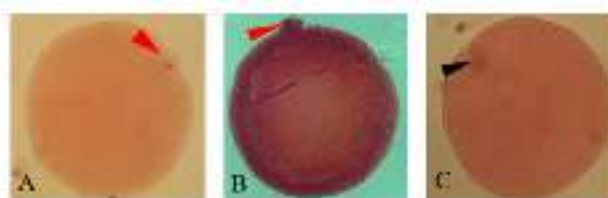
Perhitungan tingkat maturasi oosit didasarkan atas tercapainya fase *metaphase II* setelah 20 jam maturasi *in vitro*. Identifikasi oosit yang mencapai fase *metaphase II* dilakukan dengan pewarnaan aceto-orcein, selanjutnya oosit diobservasi dengan mikroskop *inverted*. Oosit dalam fase *metaphase II* ditandai dengan terlihatnya *metaphase plate* dan/atau *polar body I* (Bahrami et al., 2019). Tingkat maturasi oosit dihitung dalam persentase, yaitu jumlah oosit matur dibagi jumlah oosit yang dimaturasi dikali 100% (Kartikasari et al., 2020).

Analisis data

Data dianalisis menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji-t dengan dua sampel dengan asumsi varians sama pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis statistik dilakukan dengan perangkat lunak *Statistical Program and Service Solution* (SPSS) Versi 23.

HASIL

Pada penelitian ini dilakukan enam kali pengambilan ovarium, dan diperoleh 10-18 pasang ovarium setiap kali pengambilan. Ovarium setelah dibersihkan dari jaringan sekitarnya dan COCs hasil aspirasi folikel dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan hasil pewarnaan menggunakan aceto-orcein pada oosit disajikan pada Gambar 2. Jumlah COCs, jumlah oosit matur, dan persentase oosit matur setelah maturasi *in vitro* dengan penambahan urea pada media maturasi dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 2 Oosit sapi matur menunjukkan *polar body I* (kepala panah merah), dan *metaphase plate* (kepala panah hitam); A= kontrol, oosit dimaturasi tanpa penambahan urea; B, C= maturasi dengan penambahan urea 20 dan 40 mg/dL dalam media maturasi (pewarnaan aceto-orcein); mikroskop *Inverted Olympus* perbesaran 400x).

Tabel 1 Tingkat maturasi (% , rata-rata \pm SD) *in vitro* oosit sapi dengan penambahan urea pada media maturasi.

	A	B	maturasi (%)
P0	82	42	51,25 \pm 4,25 ^a
P1	82	43	52,43 \pm 5,45 ^a
P2	75	35	46,88 \pm 4,28 ^b

Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$); A= jumlah COCs; B= jumlah oosit matur; P0= oosit dimaturasi tanpa penambahan urea; P1= oosit dimaturasi dengan penambahan urea 20 mg/dL; P2= oosit dimaturasi dengan penambahan urea 40 mg/dL; ulangan= 6.

DISKUSI

Pada sapi perah, asupan protein yang tinggi menyebabkan peningkatan amonia dalam rumen yang selanjutnya meningkatkan pembentukan urea dalam hati, meningkatkan kadar urea dalam darah (BUN) dan dalam susu (MUN) (Xia et al., 2018). Tinggi rendahnya kadar MUN berkorelasi dengan kadar IGF-1 (Ardiansyah et al., 2019) dan kadar estrogen (Jannah et al., 2019). Kadar IGF-1 dan estrogen mempengaruhi pertumbuhan dan maturasi folikel pada sapi (Velazquez et al., 2009). Proses maturasi inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA. Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan vesicle membentuk GV dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk GVBD. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap MI. Oosit yang berada pada tahap MII merupakan oosit yang telah matur dan ditandai dengan terbentuknya polar body I (Lee et al., 2019).

Pada penelitian ini oosit yang mempunyai sitoplasma homogen serta masih mempunyai tiga lapis sel cumulus utuh atau lebih yang diproses maturasi (Gambar 1). Kualitas oosit merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan maturasi oosit. Oosit dengan sel kumulus utuh menjaga oosit dan berperan selama tahapan pembelahan meiosis serta mendukung maturasi sitoplasma. Kurangnya sel-sel kumulus akan menyebabkan penurunan metabolisme dan mengakibatkan tidak tersedianya nutrisi yang sangat dibutuhkan selama proses maturasi (Daoed et al., 2013).

Keberadaan sel kumulus dapat mendukung maturasi oosit melalui zat metabolit. Sel-sel kumulus berperan menyediakan nutrisi bagi oosit serta membantu sintesis protein untuk pembentukan zona pelusida. Ekspansi kumulus berkorelasi dengan GVBD (Da Broi et al., 2018). Berdasarkan hal tersebut, terjadinya ekspansi sel-sel kumulus dapat memperkirakan terjadinya maturasi oosit secara *in vitro* (Del Collado et al., 2017). Cairan folikel berperan dalam proses maturasi oosit serta mempunyai zat vital untuk proses perkembangan embrio (Da Broi et al., 2018).

Maturasi oosit secara *in vitro* adalah sebuah proses yang dipengaruhi oleh individual oosit, yang disebabkan oleh adanya perbedaan dalam perkembangan dan pertumbuhan oosit yang dikoleksi dari ovarium dengan aktivitas intraovarian (Conti dan Franciosi, 2018). Faktor lain yang menyebabkan yakni kondisi kultur dan penambahan hormon dan media kultur (Mbemya et al., 2018), misalnya dengan penambahan serum buatan, foetal bovine serum (Widyastuti et al., 2015), maupun Follicle Stimulating Hormone (FSH) dan Pregnant Mare's Serum Gonatotropin (PMSG) (Dianti et al., 2011). Media yang disuplementasi dengan serum perkembangan oosit lebih banyak dibandingkan media tanpa serum. Kandungan growth factor, hormon dan peptida dalam serum diduga dapat mendukung pertumbuhan dan perkembangan oosit (Puri et al., 2015). Suplemen yang digunakan dan kondisi kultur yang baik menunjang dalam meningkatkan kemampuan maturasi oosit secara *in vitro* (Daoed et al., 2013). Pada penelitian ini paparan urea 40 mg/dL pada media maturasi oosit menyebabkan penurunan persentase oosit matur. Kadar BUN yang tinggi tinggi dapat mempengaruhi proses maturasi oosit, mengubah komposisi cairan dalam uterus, menurunkan pH uterus dan mengurangi conception rates (Cheng et al., 2015). Urea dalam darah dapat berpindah melalui proses difusi pasif melalui pembatas antara darah-folikel (Baura, 2021). Urea yang masuk ke cairan folikel bersifat toksik dan dapat merusak membran sel oosit. Sel granulosa oosit yang terpapar ammonia dengan kadar tinggi dapat mengurangi kemampuannya untuk mendukung proses maturasi oosit secara *in vitro* (Nandi et al., 2018). Kadar urea yang tinggi

dalam darah dapat menginduksi denaturasi protein dan asam nukleat sehingga kehilangan struktur sekunder dan struktur tersiernya (Lambert dan Draper, 2012), karena perubahan konformasi ikatan hidrogen pada kutubnya (Wang *et al.*, 2014).

Urea dapat menyebabkan kematian pada oosit dengan cara merusak sistem membran pada oosit (Kowsar *et al.*, 2018a), yang menyebabkan stres oksidatif yang dapat memicu kegagalan maturasi oosit (Mihalas *et al.*, 2017). Urea dapat mengalami *docking* pada ZP-N domain, suatu protein spesifik pada zona pellucida sehingga mengganggu stabilitas homeostasis oosit. Urea bersifat *cytotoxic* dan mampu merusak beberapa asam amino pada oosit dan mengurangi ATP yang berperan untuk kelangsungan hidup oosit (Kowsar *et al.*, 2018a). ATP dapat digunakan untuk menyimpan dan mentranspor energy dalam sel. Kerusakan pada oosit membuat oosit harus meningkatkan ATP intraseluler dengan proses oksidasi fosforilasi serta peningkatan laju glikolisis anaerob. Akibat peningkatan laju glikolisis anaerob, terjadi akumulasi asam laktat yang secara cepat akan menyebabkan penurunan pH intraseluler (Melkonian dan Schury, 2020). Penurunan pH intraseluler akan menyebabkan kerusakan berupa lisis membran organel, lisis membran inti, dan kerusakan kromatin inti sel berupa *clumping*/pemadatan inti sel secara cepat (Miller dan Zachary, 2017). Inti sel yang rusak berkaitan dengan sintesis RNA, jika kondisi kerusakan terjadi terus-menerus, maka sel akan mati dan mengalami nekrosis (Surova dan Zhivotovsky, 2013).

Perlakuan paparan urea pada saat maturasi akan mempengaruhi perkembangan embrio, sedangkan bila paparan urea diberikan pada saat fertilisasi tidak berpengaruh terhadap perkembangan embrio. Penambahan urea pada media maturasi dapat mengubah kompetensi oosit dan menginduksi ketidakseimbangan faktor transkripsi inti sel yang berakibat menjadi blastosis yang tidak sempurna (Kowsar *et al.*, 2018b).

KESIMPULAN

Keberadaan urea 40 mg/dL pada media TCM-199 menurunkan persentase maturasi oosit sapi secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah M, Damayanti TD, Suprayogi TW, Mustofa I, Ismudiono I, Wurlina W. 2019. Correlation Between the Level of Milk Urea Nitrogen (MUN) when Insemination with Pregnancy Rate and IGF-1 Profile on Frisian Holstein Dairy Cow. *Indian J Public Health Res Dev.* 10: 2069-73.
- Bahrami M, Morris MB, Day ML. 2019. Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. *Sci Rep.* 9: 11739.
- Batista ED, Detmann E, Valadares Filho SC, Titgemeyer EC, Valadares RFD. 2017. The effect of CP concentration in the diet on urea kinetics and microbial usage of recycled urea in cattle: a meta-analysis. *Animal* 11: 1303-11.
- Baura G. 2021. Hemodialysis delivery systems, in: Baura G (Ed.). *Medical Device Technologies.* 2nd Ed. Academic Press. 229-55.
- Bazet MA, Huque KS, Sarker NR, Hossain MM, Islam MN. 2010. Evaluation of Milk Urea Nitrogen of dairy cows reared under different feed bases in the different seasons. *J. Sci. Found.* 8: 97-110.
- Boakari YL, El-Sheikh Ali H, Schnobrich M, Lofrumento K, Scoggin C, Bradecamp E, Scoggin K, Esteller-Vico A, Claes A, Lawrence L, Ball B. 2021. Relationships between blood and follicular fluid urea nitrogen concentrations and between blood urea nitrogen and embryo survival in mares. *Theriogenology* 160: 142-50.
- Cheng Z, Oguejiofor CF, Swangchan-Uthai T, Carr S, Wathes DC. 2015. Relationships between Circulating Urea Concentrations and Endometrial Function in Postpartum Dairy Cows. *Animals (Basel)* 5: 748-73.
- Conti M, Franciosi F. 2018. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events, *Hum Reprod Update.* 24: 245-66.
- Da Broi MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. 2018. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist Reprod Genet.* 35: 735-51.

- Daoed DM, Ngadiyono N, Widayati DT. 2013. Effect of Fetal Calf Serum Supplementation on In Vitro Maturation Ability of Bovine Oocytes. *Buletin Peternakan* 37: 136-42.
- Del Collado M, da Silveira JC, Oliveira MLF, Alves BMSM, Simas RC, Godoy AT, Coelho MB, Marques LA, Carriero MM, Nogueira MFG, Eberlin MN, Silva LA, Meirelles FV, Perecin F. 2017. In vitro maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. *Reproduction*. 154: 881-93.
- Dianti D, Udin Z, Jaswandi J. 2011. Pengaruh Penambahan Follicle Stimulating Hormone (FSH) dan Pregnant Mare's Serum Gonatotroprn (PMSG) dalam Sel Granulosa terhadap konsentrasi Progesteron pada Tingkat Maturasi Oosit. *Jurnal Peternakan Indonesia*, 13: 1-6.
- Fang LH, Jin YH, Jeong JH, Hong JS, Chung WL, Kim YY. 2019. Effects of dietary energy and protein levels on reproductive performance in gestating sows and growth of their progeny. *J Anim Sci Technol*. 61: 154-62.
- Getahun D, Alemneh T, Akebergn D, Getabalew M, Zewdie D. 2019. Urea Metabolism and Recycling in Ruminants. *Biomed J Sci & Tech Res* 20: 14790-6.
- Gullinński P, Salamończyk E, Młynek K. 2016. Improving Nitrogen Use Efficiency of Dairy Cows in Relation to Urea in Milk - A Review. *Anim Sci Pap Rep*. 34: 5-24.
- Jannah M, Mustofa I, Utama S, Mulyati S, Ismudiono I, Safitri E, Al-Arif MA. 2019. Identification of Estrogen Levels in Dairy Cows Based on MUN Levels and Pregnancy Rates. *Indian J Public Health Res Dev*. 10: 1834-8.
- Kartikasari D, Mulyati S, Utama S, Srianto P, Widjiati W, Plumeriastuti P. 2020. The effect of urea supplementation in maturation media of bovine oocyte in vitro towards expression of BAX, BCL-2 and BAX/BCL-2 ratio. *J Ked Hewan* 14: 16-20.
- Kowsar R, Izadi F, Sadeghi N, Riasi A, Zadegan FG, Hajian M, Nasr-Esfahani MH, Farrokhpour H, Miyamoto A. 2018a. Urea changes oocyte competence and gene expression in resultant bovine embryo in vitro. *Zygote* 26: 207-19.
- Kowsar R, Iranshahi VN, Sadeghi N, Riasi A, Miyamoto A. 2018b. Urea influences amino acid turnover in bovine cumulus-oocyte complexes, cumulus cells and denuded oocytes, and affects in vitro fertilization outcome. *Sci Rep*. 8: 12191.
- Lambert D, Draper DE. 2012. Denaturation of RNA secondary and tertiary structure by urea: simple unfolded state models and free energy parameters account for measured m-values. *Biochemistry* 51: 9014-26.
- Lavery A, Ferris CP. 2021. Proxy Measures and Novel Strategies for Estimating Nitrogen Utilisation Efficiency in Dairy Cattle. *Animals* 11: 343.
- Lee JB, Lee MG, Lin T, Shin HY, Lee JE, Kang JW, Jin DI. 2019. Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development in vitro. *Asian-Australas J Anim Sci*. 32: 956-65.
- Mbemya GT, Cadenas J, Ribeiro de Sá NA, Damasceno Guerreiro D, Donfack NJ, Alberto Vieira L, Canafistula de Sousa FG, Geraldo Alves B, Lobo CH, Santos FW, Lima Pinto FDC, Loiola Pessoa OD, Smitz J, Comizzoli P, Figueiredo JR, Rodrigues APR. 2018. Supplementation of in vitro culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. *PLoS One* 13: 1-21.
- Melkonian EA, Schury MP. 2020. Biochemistry, Anaerobic Glycolysis. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Mihalas BP, Redgrove KA, McLaughlin EA, Nixon B. 2017. Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2017: 4015874.
- Miller MA, Zachary JF. 2017. Mechanisms and Morphology of Cellular Injury, Adaptation, and Death. In: JF Zachary, Ed. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 2-43.
- Nandi S, Tripathi S, Gupta P, Mondal S. 2018. Nutritional and metabolic Stressors on ovine oocyte development and granulosa cell functions in vitro. *Cell Stress Chaperones* 23: 357-71.
- Puri G, Chaudhary SS, Singh VK, Sharma AK. 2015. Effects of fetal bovine serum and

- estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes in vitro. *Vet World* 8: 143-6.
- Putri KY, Srianto P, Lestari TD, Utama S, Wurlina W, Mustofa I. 2018. Reproductive efficiency and serum progesterone concentration on dairy cattle based on blood urea nitrogen (BUN) concentrations. *Iraqi J Vet Sci.* 32: 143-8.
- Rodney RM, Celi P, Scott W, Breinhild K, Santos JEP, Lean IJ. 2018. Effects of nutrition on the fertility of lactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 101: 5115-33.
- Roy B, Brahma B, Ghosh S, Pankaj PK, Mandal G. 2011. Evaluation of Milk Urea Concentration as Useful Indicator for Dairy Herd Management: A Review. *Asian J Anim Vet Adv* 6: 1-19.
- Surova O, Zhivotovsky B. 2013. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene* 32: 3789-97.
- Utama S, Mulyati S, Wurlina W, Mustofa I. 2018. Effect of concentrate to forage ratio on milk urea nitrogen, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Philipp J Vet Med.* 55: 25-34.
- Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. 2009. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction* 137: 161-80.
- Wang C, Chen Z, Hong X, Ning F, Liu H, Zang J, Yan X, Kemp J, Musselman CA, Kutateladze TG, Zhao R, Jiang C, Zhang G. 2014. The structural basis of urea-induced protein unfolding in β -catenin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 70: 2840-7.
- Widyastuti, R., R. Setiawan dan S.D. Rasad, S.D. 2015. Perbandingan Tingkat Kematangan Inti Oosit Sapi Pasca Maturasi *In Vitro* dengan Penambahan Serum Buatan 10 % dan Fetal Bovine Serum 10 %. *J Ilmu Ternak*, 15: 28-32.
- Xia C, Aziz Ur Rahman M, Yang H, Shao T, Qiu Q, Su H, Cao B. 2018. Effect of increased dietary crude protein levels on production performance, nitrogen utilisation, blood metabolites and ruminal fermentation of Holstein bulls. *Asian-Australas J Anim Sci.* 31: 1643-53.