

KRIPSI

**IDENTIFIKASI GDF-9 (GROWTH DIFFERENTIATION
FACTOR-9) PADA OOSIT KUMULUS KOMPLEKS
SAPI YANG DIKOLEKSI DARI FOLIKEL
ANTHRAL YANG TIDAK DIMATURASI
SECARA *IN VITRO***



Oleh :

SIGIT PRAYOGO

NIM 060610128

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2010**

**IDENTIFIKASI GDF-9 (*GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9*)
PADA OOSIT KUMULUS KOMPLEKS SAPI YANG DIKOLEKSI
DARI FOLIKEL ANTHRAL YANG TIDAK DIMATURASI
SECARA *IN VITRO***

Skripsi
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

SIGIT PRAYOGO
NIM 060610128

Menyetujui

Komisi Pembimbing



Dr. Bambang Purnomo S. R., MS., drh

Pembimbing Utama



Dr. Suherni Susilowati, M.Kes., drh

Pembimbing Serta

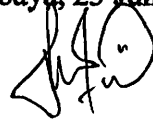
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul:

**IDENTIFIKASI GDF-9 (*GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9*)
PADA OOSIT KUMULUS KOMPLEKS SAPI YANG DIKOLEKSI
DARI FOLIKEL ANTRAL YANG TIDAK DIMATURASI
SECARA *IN VITRO***

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 23 Juni 2010



Sigit Prayogo
NIM. 060610128

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal: 08 Juli 2010

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Widjiati, drh., M.Si.

Sekretaris : Prof. Dr. Imam Mustofa, drh., M.Kes.

Anggota : Tatik Hernawati, drh., M.Kes.

Pembimbing I : Dr. Bambang Purnomo S. R., drh., MS.

Pembimbing II : Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Telah diuji

Tanggal: 29 Juli 2010

KOMISI PENGUJI SIDANG SKRIPSI

Ketua : Dr. Widjiati, drh., M.Si.

Sekretaris : Prof. Dr. Imam Mustofa, drh., M.Kes.

Anggota : Tatik Hernawati, drh., M.Kes.

Dr. Bambang Purnomo S. R., drh., MS.

Dr. Suherni Susilowati, drh., M.Kes.

Surabaya, 10 Agustus 2010

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh
NIP 130687305

IDENTIFICATION OF GDF-9 (*GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9*) IN OOCYTES CUMULUS COMPLEX THAT COLLECTED FROM ANTHRAL FOLLICLE OF BOVINE WITHOUT MATURATED BY *IN VITRO*

Sigit Prayogo

ABSTRACT

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) was glycoprotein as a part of Transforming Growth Factor Beta (TGF β) subfamily was secreted through 51 kDa molecular weight oocyte. The purpose of the study was observed GDF-9 into oocytes cumulus complex that were collected from bovine antral follicle. Method of this study based on the specificity immunocytochemistry method which avidin and biotin molecules boundary into the secondary antibody avidin-biotin complex shape. Total amount of collected oocytes were 66 (100%) and total amount of observed oocytes were 47 (71,21%) positive and 19 (28,79%) negative. Positive was marked by dark brown as an expression of chromogen on the SA-HRP complex boundaries. Negative was marked by methylene green counterstain. However, GDF-9 was observed into the collected oocytes from bovine antral follicles immaturation *in vitro* process.

Key words: GDF-9, bovine, antral follicle, immature

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur Alhamdulillah Kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan kelancaran serta kemudahan yang diberikan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian, menyusun, dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Identifikasi GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) Pada Oosit Kumulus Kompleks Sapi Yang Dikoleksi Dari Folikel Anthral Yang Tidak Dimaturasi Secara *In Vitro*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Prof. Hj. Romziah Sidik.Ph.D., Drh, atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Bapak Dr. Bambang Purnomo S. R., drh., MS. selaku pembimbing utama, Ibu Dr. Suherni Susilowati, drh. M.Kes. selaku pembimbing serta, atas segala saran dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.

Ibu Dr. Widjiati, drh., M.Si., Bapak Prof. Dr. Imam Mustofa, drh., M.Kes., Ibu Tatik Hernawati, drh. M.Kes. yang telah banyak memberikan saran dan masukan kepada penulis selama penyusunan.

Terima kasih yang sebesar – besarnya kepada Ibu Dr. Widjiati, drh., M.Si., atas segala bimbingan dan petunjuknya selama melaksanakan penelitian. Terima kasih juga penulis ingin ucapkan kepada Ibu Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes., dan staf Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya, atas bantuan teknik dalam proses penelitian ini.

Segala hormat dan terima kasih sebesar – besarnya penulis haturkan kepada Ibunda Wiwik Tripuji Heryati, Ayahanda Hariyani, Kakanda Teguh Yayansaputra dan Adinda Bagus Prayogi atas berjuta-juta dukungan, dorongan, dan doa yang telah diberikan. Serta terima kasih kepada Novelia Indriani dan sahabatku Andrika Indra P. atas dorongannya selama ini. Kepada teman-teman sepenelitian GDF-9, Ariz Juliprihanto, Desi W., Lutfiana Widya, Ahmad Brilyan, Cahya Puspita D., dan semua teman–teman PKM seperjuangan Theresia Audita G., Viski F. Hendrawan, Yusak Beato, serta semua teman di FKH khususnya angkatan 2006 dan semua pihak yang membantu terselesaikannya skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran demi perbaikan serta kesempurnaan sangat diharapkan, walaupun demikian semoga apa yang tertuang dalam skripsi ini bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Surabaya, 23 Juni 2010

Sigit Prayogo
NIM. 060610128

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMAKASIH	vii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Alat Reproduksi Hewan Betina	6
2.2 Ovarium.....	6
2.3 Oogenesis dan Folikulogenesis	7
2.4 <i>Growth Differentiation Factor (GDF-9)</i>	10
2.5 Uji Immunositokimia	12
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	14
3.1 Waktu dan Tempat.....	14
3.2 Materi Penelitian	14
3.2.1 Bahan Penelitian	14
3.2.2 Alat Penelitian	14
3.3 Prosedur Pengumpulan Data Penelitian	15
3.3.1 Koleksi Oosit.....	15
3.3.2 Pemeriksaan GDF-9 dengan Immunositokimia	15
3.4 Analisis Data	16
BAB 4 HASIL PENELITIAN	18
BAB 5 PEMBAHASAN.....	20

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	23
6.1 Kesimpulan	23
6.2 Saran	23
RINGKASAN	24
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	30

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
4.1. Jumlah Oosit Kumulus Kompleks dan Persentase GDF-9	18

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
2.1. Prinsip Pemeriksaan Uji Immunositokimia Dengan Metode Streptavidin-Biotin Complex.....	13
3.1. Kerangka Operasional Penelitian	17
4.1. Oosit Kumulus Kompleks Yang Menunjukkan Adanya GDF-9	18
4.2. Oosit Kumulus Kompleks Yang Tidak Menunjukkan Adanya GDF-9	19

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Katalog GDF9 Antibody (N-Term)	31
Lampiran 2. Komposisi Media TCM dan PBS dalam 100 ml	32
Lampiran 3. Prosedur Immunositokimia	33
Lampiran 4. Foto-foto Penelitian	34

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

BSA	= Bovine Serum Albumin
cAMP	= cyclic Adenosin Mono Phosphate
DNA	= Deoxyribonucleate Acid
FCS	= Fetal Calf Serum
FSH	= Follicle Stimulating Hormone
GDF-9	= Growth Differentiation Factor-9
IB	= Inseminasi Buatan
IVF	= In Vitro Fertilization
kDa	= kilo Dalton
LH	= Luteinizing Hormone
mRNA	= Messenger Ribonucleate Acid
NaCl	= Natrium Chlorida
PBS	= Phosphate Buffer Saline
®	= Registered (Terdaftar)
RPH	= Rumah Potong Hewan
TE	= Transfer Embrio
TGF β	= Transforming Growth Factor β
ABC	= Avidin-Biotin Complex
LAB	= Labeled Avidin-Biotin
DAB	= 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride
SA-HRP	= Streptavidin Horseradish Peroxidase



BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Jumlah sapi potong di Indonesia pada tahun 1998 sebesar 12,19 juta ekor, sedangkan pada tahun 2008 hanya tinggal 10,4 juta ekor (Ditjenak, 2008; Husodo, 2009). Jumlah tersebut semakin menurun setiap tahunnya. Setiap tahun Indonesia mengimpor sapi hidup dan daging sapi yang setara dengan 650 ribu ekor sapi per tahun. Sedangkan untuk konsumsi daging, Indonesia masih terbilang kecil sekitar 7 kilogram per hari, bila dibandingkan malaysia mencapai 45 kilogram per hari (Husodo, 2009).

Menurut Mahaputra (2001), protein hewani mempunyai kandungan protein yang lebih baik daripada protein nabati. Hal ini disebabkan kandungan protein asam lemak esensial sangat dibutuhkan untuk perkembangan otak. Protein dibutuhkan pada proses metabolisme selama perkembangan dan pertumbuhan. Demi mencukupi kebutuhan protein hewani, dibutuhkan peningkatan produktivitas ternak.

Dibutuhkan alternatif upaya untuk meningkatkan populasi ternak, diantaranya dengan bioteknologi reproduksi yaitu metode Transfer Embrio (TE). Untuk melakukan transfer embrio dibutuhkan embrio yang bagus dan dalam jumlah yang cukup. Untuk memperoleh embrio dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pada proses *in vitro*, untuk mendapatkan embrio dengan kualitas yang bagus dibutuhkan proses maturasi terlebih dahulu. Selama proses maturasi *in vitro* banyak faktor yang

mempengaruhi. Mengingat banyak faktor yang berperan pada proses maturasi oosit maka perlu diketahui sintesis dan fungsinya. (Hurk and Zhao, 2005)

Pada proses maturasi oosit, diketahui adanya peran *growth factor*. *Growth Factor* merupakan faktor lokal yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan differensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus. Selama proses maturasi banyak *growth factor* yang berperan dalam proses pematangan oosit seperti : *Insulin-like Growth Factor* (IGF), *IGF-Binding Protein* (IGFBP), *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor Alfa* (TGF α), *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β), *Growth Differentiation factor-9* (GDF-9) (Widjiati dkk., 2008).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) merupakan salah satu *growth factor* yang mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis DNA (*Deoxyribonucleate Acid*) pada sel granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung (Vitt *et al.*, 2000). GDF-9 berfungsi sebagai regulator pada pertumbuhan dan differensiasi pada jaringan embrional maupun jaringan dewasa. GDF-9 disintesis oleh sel somatik ovum yang memiliki peran pada pertumbuhan dan fungsi oosit. Keberadaan dan peran GDF-9 pada oosit sangat dibutuhkan pada proses maturasi dan folikulogenesis ovarium. (Mazerbourg *et al.*, 2003).

Mekanisme kerja GDF-9 pada sel-sel granulosa mampu mengubah lingkungan intra folikular, yang akan berpengaruh pada kemampuan oosit untuk berkembang menjadi embrio praimplantasi yang normal secara morfologis (Vitt *et al.*, 2000). Peran GDF-9 juga dibuktikan dengan adanya

laju pertumbuhan folikel primer dan folikel preovum pada saat *in vitro*. GDF-9 telah dibuktikan peran dan fungsinya pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel antral dan folikel preovum. (Laissue dan Maitre, 2006 ; Spicer *et al.*, 2007).

GDF-9 berperan pada awal pembentukan oosit dimana oosit masih belum matang. Gambaran oosit belum matang (*immature oocyte*) ditunjukkan oleh oosit kompleks dengan kumulus ooforus dan korona radiata yang kompak (Rimayanti, 2005).

Menurut penelitian Juliprihanto (2010), GDF-9 teridentifikasi pada oosit yang dikoleksi dari folikel antral yang dimaturasi secara *in vitro* menggunakan metode immunositokimia, yang menunjukkan hasil GDF-9 positif sebesar 71,87%. Berdasarkan peran GDF-9 terjadi pada awal pertumbuhan oosit yaitu oosit masih belum matang, maka pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi GDF-9 pada oosit yang dikoleksi dari folikel antral tanpa proses maturasi, guna mengetahui adanya kemungkinan GDF-9 pada oosit yang belum matang.

1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang di atas dapat diambil suatu permasalahan mendasar apakah *Growth Differentiation Factor* (GDF-9) dapat diidentifikasi pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral yang tidak dimaturasi secara *in vitro*?

1.3 Landasan Teori

Dari penelitian yang dilakukan oleh Widjiati dan Rimayanti, (2002) diketahui bahwa oosit yang dipanen dari folikel ukuran 3-12 mm persentase jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II adalah 50%, sedangkan oosit yang dipanen dari folikel ukuran kurang dari 3 mm hanya mencapai 12%. Hal ini menunjukkan bahwa kualitas yang dihasilkan dari folikel berdiameter besar lebih baik dari pada oosit yang dipanen dari folikel berdiameter kecil. Demikian juga tingkat fertilisasi oosit yang dikoleksi dari beberapa ukuran folikel berpengaruh terhadap angka fertilisasi. Folikel ukuran 1-2 mm; 3-5 mm dan 6-8 mm menghasilkan angka fertilitas yang bervariasi, secara berurutan adalah 53%, 90%, dan 91,6%.

Folikel yang berdiameter besar mengandung oosit yang semakin matang. Hal tersebut tidak luput dari GDF-9 yang telah dibuktikan peran serta fungsinya pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel antral dan folikel preovum. (Laissue dan Maitre, 2006; Spicer *et al.*, 2007).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) berfungsi sebagai stimulator pada saat perkembangan folikel primer. GDF-9 bekerja mengatur proliferasi sel granulosa dan mengatur fungsi sel kumulus sejak masa preovulasi. Jika terjadi peningkatan aktivitas reproduksi betina maka diikuti dengan peningkatan kadar GDF-9 yang dapat dideteksi melalui hybridasi ovarium (Tamer dan David, 2005).

Growth Differentiation Factor (GDF-9) memungkinkan terjadinya ekspansi kumulus dan peningkatan *Luteinizing Hormone (LH)* dalam sel

granulosa. Mekanisme GDF-9 dalam LH akan menurunkan cAMP sehingga merangsang perluasan kumulus kompleks oosit dan memproduksi asam hialuronat yang dapat di indikasi pada oosit yang telah matang (Vitt *et al.*, 2000).

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi *Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)* pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral yang tidak dimaturasi secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil adalah untuk mengidentifikasi *Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)* pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral yang tidak dimaturasi serta mampu mendukung informasi ilmiah penelitian tentang GDF-9. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan pada media *in vitro* dengan penambahan GDF-9 sebagai substansi atau bahan tambahan pada media kultur *in vitro*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alat Reproduksi Hewan Betina Sapi

Alat reproduksi betina meliputi dua buah ovarium, dua buah tuba falopii, uterus, vagina dan vulva. Pada umumnya, ovarium terdapat dua buah, yaitu kanan dan kiri yang terletak di dalam rongga pelvis. Tuba falopii merupakan saluran reproduksi betina yang kecil, berliku-liku dan kenyal serta terdapat sepasang dan merupakan saluran penghubung antara ovarium dan uterus. Uterus biasanya memiliki dua buah tanduk, satu buah tubuh, dan satu buah leher rahim. Tipe bentuk uterus sapi adalah tipe bipartitus yaitu hanya mempunyai satu servik uteri, korpus uterinya jelas dan cukup panjang serta kedua kornua uteri dan korpus dipisahkan oleh septum (Hafez, 2000).

Vagina merupakan saluran kelamin betina yang berfungsi sebagai tempat penumpahan semen. Vagina juga merupakan jalur pengeluaran fetus dan plasenta pada saat partus (Tomaszewka *et al.*, 1991).

2.2 Ovarium

Pada mamalia ovarium merupakan alat kelamin betina yang bertanggung jawab atas diferensiasi dan pelepasan oosit matang untuk fertilisasi dan perkembangbiakan dari spesies. Ovarium juga sebagai organ endokrin yang memproduksi hormon steroid yang memungkinkan berkembangnya ciri-ciri seksual betina sekunder dan mendukung kebuntingan (Hafez, 2000).

Secara normal, struktur ovarium sangat bervariasi tergantung pada spesies, umur dan tahap siklus birahi. Ovarium sapi berbentuk ovoid dan kira-kira berukuran 4 x 1,2 x 1,5 cm (Gilbert, 1988).

Ovarium terdiri dari bagian korteks dan medulla. Korteks merupakan daerah tepi yang lebar, mengandung folikel dan korpus luteum, dan dibalut oleh epitel permukaan berbentuk kubus rendah. Stroma korteks berupa jaringan ikat longgar. Tunika albugenia tebal dan merupakan lapisan yang langsung di bawah epitel permukaan. Tunika albugenia dapat menipis dan bahkan menghilang karena terdesak oleh perkembangan folikel ovarium serta korpus luteum selama aktivitas ovarium meningkat (Gilbert, 1988). Sedangkan medulla merupakan bagian dalam yang mengandung saraf, banyak pembuluh darah dan pembuluh limfe, terdiri dari jaringan ikat longgar dengan jalur otot polos, berlanjut dengan otot polos mesovarium (Hafez, 2000).

2.3. Oogenesis dan Folikulogenesis

Oogenesis merupakan proses pembentukan, pertumbuhan dan pematangan sel kelamin betina. Oogenesis berhenti menjelang lahir dan dilanjutkan setelah hewan dewasa kelamin. Secara umum oogenesis dibagi menjadi tiga tahap yaitu proliferasi atau pembentukan oogonia, tahap pertumbuhan atau meiosis dan tahap pematangan atau transformasi (Tomaszewka *et al.*, 1991; Poernomo dkk., 2000).

Pada tahap proliferasi, sel germinal primordial membagi diri secara mitosis. Hasil proliferasi berupa oogonium. Jumlah oogonium untuk setiap ovarium berkisar antara 40.000-300.000 bahkan lebih tergantung pada jenis

hewan. Tahap pertumbuhan dimulai sejak fetus sampai menginjak umur dewasa kelamin ditandai oleh isi sitoplasma bertambah banyak oleh kuning telur (deuteroplasma), membran sel membentuk zona pelusida dan terjadi proliferasi sel-sel folikel. Sel-sel folikel bertindak sebagai pengasuh dan memberi nutrisi pada deuteroplasma. Hasil tahap pertumbuhan berupa oosit primer. Pertumbuhan oogonium menjadi oosit primer dapat dibagi menjadi dua tahap. Tahap pertama terjadi pertumbuhan yang cepat disertai dengan perkembangan folikel kira-kira sampai terbentuknya antrum folikel. Tahap berikutnya oosit tidak bertambah besar, tetapi folikel dengan cepat bertambah besar disebabkan oleh hormon yang dihasilkan oleh kelenjar hipofise (Hardjopranto, 1995; Poernomo dkk., 2000).

Tahapan pertama perkembangan folikel terjadi pada waktu hewan betina masih dalam kandungan dan setelah lahir. Dalam tahap ini terjadi folikel primer yang berasal dari satu sel epitel benih yang membelah diri (Ismudiono, 1999). Folikel primer paling muda dikelilingi oleh epitel pipih selapis, disebut folikel primordial. Pada stadium lebih lanjut, epitel berubah menjadi kubus sebaris. Folikel primer berdiameter sekitar 40 μm , dikelilingi oleh membran basal dan terletak di bagian luar korteks di bawah epitel permukaan (Dellmann and Brown, 1992). Folikel primordial sapi teraktivasi menjadi folikel primer pada hari ke-140 kebuntingan. Folikel primer mengandung oosit dengan diameter kira-kira 30 μm yang dikelilingi oleh sel-sel granulose berbentuk kubus (Mayes, 2002).

Pertumbuhan pada tahap kedua meliputi pertumbuhan folikel primer menjadi folikel sekunder. Tidak semua folikel primer menjadi folikel sekunder tapi hanya sebagian saja, menurut perkiraan kurang dari sepertiga dari jumlah

folikel primer (Ismudiono, 1999). Pada sapi, folikel sekunder muncul pada hari ke-210 kebuntingan pada saat sel-sel folikuler dari folikel primer melalui pembelahan mitosis. Folikel sekunder setidaknya mengandung dua lapis sel-sel granulose dan oosit berdiameter antara 50-60 μm (Mayes, 2002). Folikel sekunder ditandai oleh berkembangnya 3-5 μm lapis glikoprotein tebal, disebut *zona pellucida*, mengitari membran plasma oosit. Terdapat penetrasi parsial di daerah ini oleh mikrovili permukaan oosit. *Zona pellucida* dihasilkan oleh sel-sel granulose yang mengitari oosit (Dellmann dan Brown. 1992).

Pada tahap ketiga, terjadi perkembangan selanjutnya folikel sekunder menjadi folikel tersier yang ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulose, sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan (Ismudiono, 1999). Folikel tersier atau folikel antral ditandai dengan adanya rongga yang disebut antrum. Antrum adalah rongga yang berisi cairan folikel. Antrum pertama kali terdeteksi di folikel sapi yang berdiameter antara 0,12 – 0,28 mm. folikel antral pertama muncul sekitar hari ke-230 kebuntingan pada sapi (Mayes, 2002). Oosit primer pada folikel tersier berdiameter 150 – 300 μm tergantung pada spesies. Bentuknya bulat, inti terletak di tengah dengan jalinan kromatin tipis nukleolus yang jelas. Karena folikel antral mulai membesar dengan meningkatnya cairan folikel, oosit terdesak kearah tepi (eksentrik), lazimnya ke bagian folikel yang paling dekat dengan pusat ovarium. Pada folikel tersier yang besar, bentuk sel-sel granulose yang langsung mengitari oosit menjadi silinder dengan susunan radial, dikenal sebagai korona radiata. Sel-sel yang membentuk korona radiata dianggap menjamin nutrisi bagi oosit. Pada ruminansia, sel-sel

tersebut hilang sejak terjadi ovulasi (Dellmann dan Brown, 1992). Pertumbuhan folikel tersier menjadi folikel de Graff, oleh beberapa peneliti hanya dinyatakan sebagai proses pemasakan saja, sebab folikel tersier hanya berbeda besarnya dan terjadi hanya beberapa hari menjelang estrus (Ismudiono, 1999).

Folikel de Graff berkembang terus, diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum, pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel theca, yang akan merangsang pelepasan *leuteinizing hormone* (LH), sekresi LH akan menggerak terjadinya ovulasi. Saat akan terjadi pelepasan polar body I dan ovum memasuki pembelahan meiosis II (Hafez, 2000).

2.4. Growth Differentiation Factor (GDF-9)

Growth Differentiation Factor (GDF-9) adalah suatu glikoprotein yang termasuk dalam subfamili dari *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β) yang disekresi oleh oosit dengan berat molekul 51 kDa. Seperti ligan-ligan dari famili TGF β lainnya, ligan GDF-9 diketahui berhubungan dengan serine/threonine kinase. *Growth Differentiation Factor* (GDF-9) mempunyai kemampuan untuk merangsang proliferasi sel granulosa dan menghambat differensiasinya. Kekurangan GDF-9 akan menyebabkan perkembangan folikel terhenti, tidak adanya lapisan sel theca di sekeliling folikel, serta berkurangnya kemampuan pembelahan meiosis pada oosit (Vitt *et al.*, 2002).

Growth Differentiation Factor (GDF-9) merupakan faktor differensiasi dan pertumbuhan sama seperti faktor tumbuh kembang lainnya yaitu *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β), *Mullerian Inhibitory Substance*

(MIS), *Activin* dan *Inhibin*, termasuk juga *Bone Morphogenetic Protein* (BMP's) (Mazerbourg *et al.*, 2003). *Growth Differentiation Factor* (GDF-9) ditemukan pertama kali pada awal 1990 pada rodentia (Mc Pherron dan Lee, 1993), pada sapi dan kambing (Bodensteiner *et al.*, 1999), pada manusia (Aaltonen *et al.*, 1999) dan juga pada ovarium babi. *Growth Differentiation Factor* (GDF-9) berperan dalam proses pematangan sel telur yang merupakan ligan spesifik reseptor TGF β sehingga akan menghalangi transfer cAMP dari granulosa ke oosit akibatnya cAMP dalam oosit turun dan proses maturasi dapat berjalan. Kekurangan GDF-9 akan mengganggu proses pematangan sel telur (Sendai *et al.*, 2001).

Banyak penelitian telah membuktikan pentingnya peran GDF-9 sebagai stimulator pada saat perkembangan folikel primer. Peran GDF-9 juga dibuktikan adanya laju pertumbuhan folikel primer, folikel preantral, dan folikel preovum. Berubahnya cumulus dan peningkatan produksi androgen pada sel theca mungkin terjadi sebagaimana sel granulosa merangsang produksi inhibin.

Pada folikel primordial tidak diketemukan protein GDF-9 karena reseptor mRNA GDF-9 baru disekresikan pada stadium folikel primer (Sou *et al.*, 2006). GDF-9 bekerja sinergis dengan BMP-15 dalam mengatur proliferasi sel granulosa. Munculnya GDF-9 digunakan untuk mengatur fungsi sel kumulus sejak masa preovulasi. (Sophie, 2004).

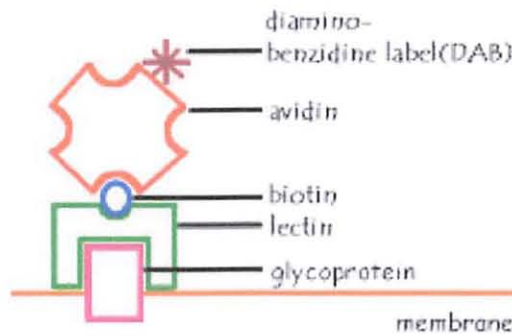
Growth Differentiation Factor (GDF-9) memungkinkan terjadinya ekspansi kumulus dan peningkatan LH dalam sel granulosa. Mekanisme GDF-9 dalam LH akan menurunkan cAMP sehingga merangsang perluasan kumulus

kompleks oosit dan memproduksi asam hialuronat yang dapat di indikasi pada oosit yang telah matang (Vitt *et al.*, 2000).

2.5. Uji Immunositokimia

Seperti diketahui bahwa uji immunositokimia adalah suatu uji diagnosis yang spesifik dan saat ini telah berkembang pesat berkat adanya antibodi monoklonal dan dapat digunakan untuk berbagai penelitian sebagai uji penunjang dalam menentukan diagnosis secara tepat adanya bentuk kelainan jaringan baik pada tumbuh-tumbuhan, hewan dan manusia (Wasito, 1997). Immunositokimia digunakan pada sel sedangkan immunohistokimia pada tingkat jaringan namun prinsip yang digunakan sama.

Pada tahun 1974, perwarnaan Imuno yang pertama diaplikasikan pada jaringan formalin fiksatif dan paraffin embedding. Pada masa yang sama, penggunaan antibodi monoklonal juga diperkenalkan. Sepuluh tahun kemudian, prosedur jembatan peroxidase telah dikembangkan, diantaranya Guesdon memperkenalkan teknik labeled avidin-biotin (LAB) pada tahun 1979 dan Hsu memperkenalkan teknik avidin biotin complex (ABC) pada tahun 1981. Teknik ini menggunakan avidin atau streptavidin yang berafinitas tinggi untuk biotin yang berkesan dan memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan teknik Peroxidase- anti peroxidase (Jasani, 1993).



Gambar 2.1. Prinsip pemeriksaan uji immunositokimia dengan metode *streptavidin-biotin complex*. (Chau, 2004)

Teknik avidin biotin mengambil prinsip ikatan pada avidin. Primer biotinylated atau antibodi kedua ditambahkan ke dalam objek dalam hal ini bisa jaringan atau sel. Langkah ini diikuti dengan memasukkan avidin. kemudian enzim biotinylated, fluorochrome, atau penunjuk elektron mikroskopik ditambahkan untuk melihat gambaran ikatannya. Oleh karena itu antibodi yang berbiotin atau lektin adalah jembatan bagi avidin yang berfungsi sebagai penunjuk (marker) molekul yang berbiotin. (Jasani, 1993).



BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai Desember 2009 di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* dan pemeriksaan uji Immunositokimia di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 64 ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) sebagai sampel penelitian. Sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan koleksi oosit. Pemilihan sampel menggunakan metode *Accidental sampling*. Media kimia yang dibutuhkan adalah Phosphate Buffer Saline (media pencuci oosit), medium TCM-199, *Bovine Serum Albumin* (BSA) 3%, Gentamycin Sulfat, Aceto orcein, Alkohol 70%, NaHCO₃, dan *aquadest*.

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan meliputi : Jangka sorong, jarum suntik 18-G, mikroskop inverted, *syringe dispossable* 10 cc, erlenmeyer, gunting, laminar flow, pinset, selang infus, gelas ukur, *petridish dispossable*

(nuclon[®]), pipet pasteur, *petridish glass*, *beaker glass*, pembakar bunsen, filter miliphore diameter 0.2 μm (Whatman[®], German Science), mikropipet otomatis, gelas objek, dan gelas penutup.

3.3. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

3.3.1 Koleksi Oosit

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) dan disimpan dalam NaCl fisiologis yang diberi tambahan Gentamycin Sulfat 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Lalu ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis yang diberi Gentamycin Sulfat sampai beberapa kali pencucian hingga cairan pencuci menjadi jernih. Oosit diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18-G yang dihubungkan dengan *syringe* sepuluh milimeter dan berisi satu milimeter PBS yang telah diberi tambahan 3% BSA dan 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin Sulfat. Lalu dilakukan koleksi oosit dari folikel antral, oosit dicuci secara berturut-turut, tiga kali di dalam medium PBS dan tiga kali di dalam TCM 199.

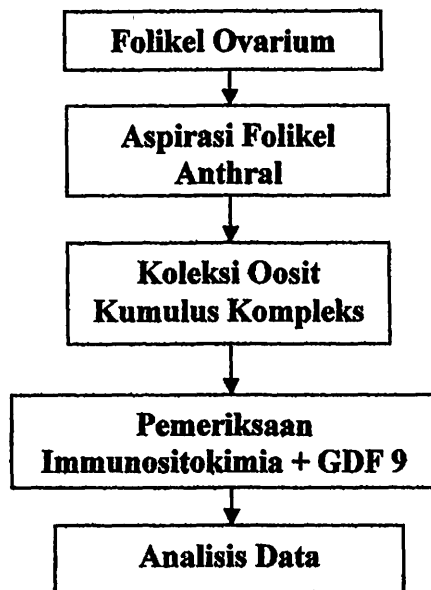
3.3.2 Pemeriksaan GDF-9 dengan Immunositokimia

Penelitian ini menggunakan teknik *Avidin-biotin Complex* yang pertamakali di temukan oleh Hsu pada tahun 1981 (Jasani, 1993). Oosit dengan kompleks kumulus difiksasi pada gelas objek, selanjutnya dilakukan fiksasi agar oosit dengan kompleks kumulus menempel pada gelas objek. Selanjutnya dilakukan pewarnaan immunositokimia dengan metode *avidin-biotin complex* untuk mengetahui adanya GDF-9. Dalam penelitian ini oosit

kumulus kompleks yang telah dikoleksi diatas gelas objek yang telah dilapisi poly L-lysine dan difiksasi lalu dikeringkan dalam udara terbuka. Setelah kering kemudian dibilas dengan PBS 10% 2 kali masing-masing 5 menit. Lalu diberi H₂O₂ 3% setelah itu didiamkan 10 menit dan dibilas kembali dengan PBS. Kemudian antibodi GDF-9 (*GDF9 Antibody (N-term) Purified Rabbit Polyclonal Antibody*) yang telah diencerkan dengan diluent-Ab 5% diteteskan dan didiamkan 45-60 menit. Lalu diberi streptavidin dan ditetesi dengan biotinylated link. Setelah itu di *counterstaining methylen green* kemudian diamati di bawah mikroskop. Hasil yang positif akan terlihat warna kecoklatan.

3.4. Analisis Data

Penelitian identifikasi GDF-9 ini menggunakan metode eksploratif laboratorik. Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi kondisi diusahakan sama.



Gambar 3.1. Kerangka Operasional Penelitian

Ovarium sapi diambil oositnya dari folikel anthral secara aspirasi. Lalu oosit tersebut dikoleksi dan dilakukan pemeriksaan immunositokimia. Kemudian dilakukan analisis data dengan metode eksploratif laboratorik.



BAB 4

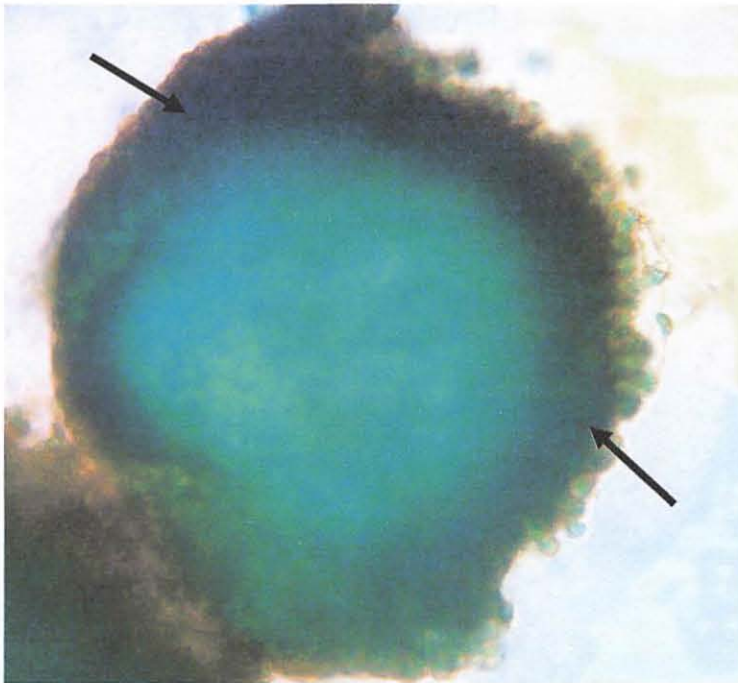
HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

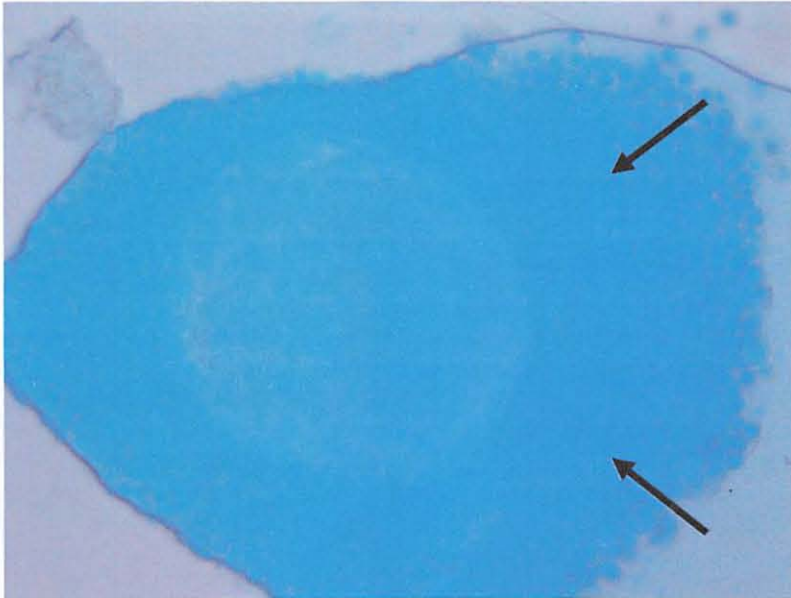
Hasil identifikasi dari *Growth Differentiation Factor -9* (GDF-9) yang diperoleh dari oosit yang tidak dimaturasi dengan metode immunositokimia diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 4.1. Jumlah oosit dan persentase GDF-9

KELOMPOK	JUMLAH OOSIT	PENGAMATAN	
		GDF-9 POSITIF	GDF-9 NEGATIF
ANTHRAL	66	47 (71,21 %)	19 (28,79%)



Gambar 4.1. Oosit kumulus kompleks yang menunjukkan adanya GDF-9 (pembesaran 400 X). Warna cokelat gelap (yang ditunjuk dengan tanda panah) menunjukkan adanya ikatan antara GDF-9 dengan antibodi GDF-9.



Gambar 4.2. Oosit kumulus kompleks yang tidak menunjukkan adanya GDF-9 (pembesaran 400 X). Tanda panah menunjukkan granulosa yang tidak memvisualisasi warna coklat

Dari tabel di atas tampak bahwa pengamatan jumlah oosit yang tidak dimaturasi menunjukkan adanya GDF-9 cukup tinggi yaitu sebesar 71,21 % sedangkan yang tidak ditemukan GDF-9 sebesar 28,79 %. Adanya ikatan antara antigen dan antibodi GDF-9 divisualisasikan dengan warna coklat gelap pada sel granulosa oosit.



BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini yaitu teridentifikasinya GDF-9 pada folikel antral yang tidak dimaturasi dengan persentase 71,21% yang terlihat dari adanya warna coklat gelap pada oosit kumulus kompleks. Warna coklat gelap pada sel granulosa oosit merupakan visualisasi adanya ikatan antara antigen dan antibodi GDF-9. Adanya oosit kumulus kompleks yang tidak mengandung GDF-9 kemungkinan belum disekresikannya GDF-9, karena GDF-9 sangat diperlukan saat proses folikulogenesis dan maturasi oosit (Vitt *et al.*, 2000). Tidak ditemukannya GDF-9 pada oosit kumulus kompleks akan divisualisasi dengan warna hijau sesuai dengan warna *counterstain methylen green*.

Pada hasil diatas menunjukkan bahwa pada oosit kumulus kompleks yang belum matang juga dihasilkan GDF-9 yang diuji dan dibuktikan dengan imunositokimia. Metode yang digunakan pada imunositokimia ini berprinsip dari hasil reaksi antigen-antibodi dapat diidentifikasi pada spesimen karena antibodi diikat oleh suatu penanda/*marker* yang dapat divisualisasi, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut. Bahan aktif itu harus terkumulasi dalam jumlah yang cukup di dalam sel atau jaringan sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik dan dapat divisualisasikan (Nurhidayat, 2002).

Metode imunositokimia ini menggunakan metode *Avidin-Biotin Complex*. Antigen dalam hal ini GDF-9 diikat oleh antibodi dalam dua tahap. Antibodi primer berikatan secara langsung dengan GDF-9, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinisasi. Pada

setiap tangan antibodi sekunder telah terkonjugasi dengan biotin yang berikatan dengan molekul avidin. Komplek ikatan avidin-biotin antibodi ini yang dapat mengidentifikasi lokasi dari GDF-9. Dalam hal ini menggunakan kespesifikan ikatan antara molekul avidin dan biotin SA-HRP (*Streptavidin Horseradish Peroxidase*) yang terdapat pada antibodi sekunder yang membentuk kompleks avidin biotin melalui molekul avidin (Nurhidayat, 2002).

Kromogen yang digunakan adalah DAB (*3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride*). Dalam larutan kromogen ini telah mengandung peroksida (H_2O_2) sebagai substansi penanda yang akan membentuk kompleks dengan enzim peroksidase dalam kompleks SA-HRP. Kompleks yang terbentuk dalam kromogen DAB akan menghasilkan warna cokelat gelap. Kromogen ini mempunyai ikatan yang sangat kuat dengan peroksida sehingga dengan proses dehidrasi dan *clearing* tidak akan mengalami perubahan warna. Visualisasi detail menggunakan *counterstain* dengan *methylen green* (Beesley, 1995).

Peran *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) pada folikel preantral adalah untuk pembentukan dan ekspansi kumulus atau sel granulosa sedangkan pada folikel antral, GDF-9 bekerja sinergis dengan LH untuk proses ovulasi. Adapun peran GDF-9 pada oosit yang dimaturasi maupun yang tidak dimaturasi adalah sama yaitu untuk mencapai tahap metafase II yang diindikasikan pada oosit yang telah matang (widjiati, 2008).

Growth Factor seperti GDF-9 ini berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus. Hal ini penting dalam proses folikulogenesis dan maturasi oosit (Vitt *et*

al., 2000). Peran GDF-9 hanya terbatas pada saat perkembangan folikel primer dan folikel besar atau folikel antral (Mazerbourg *et al.*, 2003).

GDF-9 merupakan protein yang mempengaruhi berbagai fungsi oosit termasuk sintesis DNA pada membran sel granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung. Penurunan cAMP merupakan awal permulaan proses meiosis. Tahapan meiosis dipertahankan oleh transfer cAMP dan sekresi LH akan menghalangi transfer cAMP ke oosit sehingga terjadi penurunan cAMP (Vitt *et al.*, 2000).

GDF-9 menghambat produksi cAMP yang distimulasi FSH, dan berperan pada proses steroidogenesis melalui sebuah *pathway* terlepasnya stimulasi cAMP. GDF-9 berfungsi sebagai *ligand* spesifik bagi reseptor tipe I yang berinteraksi dengan reseptor tipe II TGF β setelah pengikatan *ligand* dan fosforilasi reseptor menyebabkan transduksi sinyal (Duffy, 2003). GDF-9 bersifat autokrin dan berinteraksi dengan reseptor serine kinase spesifik yang ada di sel granulosa. Sebelum proses maturasi oosit, sekresi GDF-9 berjalan pada sel granulosa. Hal ini terdeteksi dengan pewarnaan immunositokimia (Widjiati, 2007).

Dapat teridentifikasinya GDF-9 pada granulosa dari oosit menunjukkan bahwa tanpa proses maturasi pun granulosa oosit masih dapat menunjukkan adanya GDF-9. Hal ini membuktikan peran GDF-9 telah dimulai pada oosit di dalam folikel antral. Tapi masih perlu diadakan penelitian lebih lanjut tentang identifikasi oosit kumulus kompleks yang dikoleksi dari folikel sebelum antral untuk mengetahui sejak kapan GDF-9 ini berperan dalam folikulogenesis.



BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa GDF-9 teridentifikasi pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral yang tidak dimaturasi dengan metode immunositokimia yang divisualisasikan warna coklat gelap pada lapisan granulosa oosit kumulus kompleks sebagai indikasi ikatan GDF-9 dengan anti GDF-9 sebesar 71,21 %.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disarankan yaitu :

1. Dapat digunakannya metode immunositokimia untuk mengidentifikasi GDF-9 pada folikel antral yang tidak dimaturasi secara *in vitro*.
2. Perlu perbandingan ada tidaknya GDF-9 pada folikel selain folikel antral dan pengkajian lebih lanjut tentang mekanisme GDF-9 pada proses folikulogenesis serta dibandingkan peran GDF-9 antara oosit yang dimaturasi dan tidak dimaturasi.



RINGKASAN

RINGKASAN

Untuk melakukan transfer embrio dibutuhkan embrio yang bagus dan dalam jumlah yang cukup. Untuk memperoleh embrio dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu secara *in vivo* maupun *in vitro*. Pada proses *in vitro*, untuk mendapatkan embrio dengan kualitas yang bagus dibutuhkan proses maturasi dan fertilisasi *in vitro* terlebih dahulu. Selama proses maturasi *in vitro* banyak faktor yang mempengaruhi, salah satunya adalah *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9). *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) merupakan salah satu *growth factor* yang mempengaruhi berbagai fungsi sel ovari termasuk sintesis DNA (*Deoxyribo Nucleic Acid*) pada sel granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung. GDF-9 berfungsi sebagai regulator pada pertumbuhan dan differensiasi pada jaringan embrional maupun jaringan dewasa.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral yang tidak dimaturasi secara *in vitro*. Manfaat yang dapat diambil adalah untuk mengidentifikasi *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) pada oosit kumulus kompleks sapi yang dikoleksi dari folikel antral tanpa proses maturasi oosit dan mendukung informasi ilmiah penelitian tentang GDF-9. Hasil penelitian ini diharapkan dapat diaplikasikan pada transfer embrio dengan penambahan GDF-9 sebagai substansi pada media kultur *in vitro*.

Penelitian ini menggunakan ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) sebagai sampel penelitian. Sampel selanjutnya dibawa ke Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga untuk dilakukan koleksi oosit kumulus kompleks. Selanjutnya dilakukan pewarnaan immunositokimia dengan metode *avidin-biotin complex* untuk mengetahui adanya GDF-9 di laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Hasil identifikasi dari *Growth Differentiation Factor -9* (GDF-9) yang diambil dari oosit kumulus kompleks yang tidak dimaturasi dengan metode immunositokimia menunjukkan adanya GDF-9 cukup tinggi yaitu sebesar 71,21 % sedangkan yang tidak ditemukan GDF-9 sebesar 28,79 %. GDF-9 ditandai dengan warna coklat pada sel granulosa oosit karena adanya ikatan antara antigen dan antibodi GDF-9.

Adanya oosit kumulus kompleks yang tidak mengandung GDF-9 kemungkinan belum disekresikannya GDF-9, karena GDF-9 sangat diperlukan saat proses folikulogenesis dan maturasi oosit. Tidak ditemukannya GDF-9 pada oosit kumulus kompleks akan divisualisasi warna hijau sesuai dengan warna *counterstain methylen green*. Dapat teridentifikasinya GDF-9 pada granulosa dari oosit menunjukkan bahwa tanpa proses maturasi pun granulosa oosit masih dapat menunjukkan adanya GDF-9. Hal ini membuktikan peran GDF-9 telah dimulai pada oosit kumulus kompleks di dalam folikel antral.



DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Aaltonen J, M. P. Laitinen, K. Vuojolainen, R. Jaatinen, N. Horelli-Kuitunen, L. Seppa, H. Louhio, T. Tuuri, J. Sjoberg, R. Butzouw, O.Hovata, L. Dale and O. Ritvos. 1999. Human *Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)* and its novel homolog GDF-9B are expressed in oosit during early folliculogenesis. *J. Clin Endoc and Metab.* 84 2744-2750.
- Beesly, J.E. 1995. *Immunocytochemistry*. IRL Press. New York.
- Bodensteiner, K. J., C. M. Clay, C. L. Moller and H. R. Sawyer. 1999. Molecular cloning on bovine growth differentiation factor in ovine and bovine ovaries. *J. Biol Reprod.* 60: 381-386.
- Chau, H. T. 2004. *Lectin Histochemistry in Ventricular and Aqueduct Ependyma in the Brains of H-Tx Rats with Inherited Fetal-onset Hydrocephalus*. *J. of Undergraduate Research*. Vol.6 Issue.4
- Dellmann, H. D. dan E. M. Brown. 1992. *Buku Teks Histologi Veteriner*. Penerbit Universitas Indonesia, UI Press. Jakarta. Hal: 486-500.
- Direktorat Jenderal Peternakan (Ditjennak), Departemen Pertanian. 2008. *Statistik Peternakan*. Direktorat Jenderal Peternakan, Jakarta.
- Duffy. M.D 2003. Growth Differentiation Factor 9 is Expressed by Primate Follicle throughout The Perioovulatory Interval. *J. Biol Reprod.* 69: 725-732.
- Gilbert S.F. 1988. *Development Biology*. 2nd. Sinaeur Associated Inc. Sunderland Massachusetts. 787-805.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm animal 7th Edition*. Lappincott Williams and Wilkin. Philadelphia.
- Hardjopranto, S. 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Hurk R and J. Zhao. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *J. Theriogenology* 63 : 1717-1751
- Husodo, S.Y. 2009. Sapi Potong Lebih Banyak Dibanding Sapi Lahir. *Kompas*. 13 Februari 2009

- Ismudiono, 1999. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Lab Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Jasani, B. and Schmidt, K. W. 1993. Immunocytochemistry in Diagnostic Histopathology. Medical Division of Langman Group UK Limited : Prostate page.
- Juliprihanto, A. 2010. Identifikasi GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) Pada Oosit Sapi yang Dikoleksi dari Folikel Anthral yang Dimaturasi Secara *In Vitro*. [Skripsi]. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kent, T. H. 1998. Adenocarcinoma Prostate. Introduction to Human Disease 4th edition. 324-325.
- Laissue, P. and C. Maitre. 2006. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *European Journal of Endocrinology*, 154 (5) 739-744
- Mahaputra, L. 2001 Ilmu Kebidanan Veteriner. Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Mayes, M. 2002. The Meiotic Arrest of Bovine Oocyte. Thesis. Faculte Des Sciences De L' Agriculture et De L' Alimentation Université Laval. Cuebec.
- Mazerbourg, S., C. Klein, A. J. Hsueh, N. Kaivo-Oja, O. Ritvos, D. G. Motterhead and O. Korchynsky. 2003. *Growth differentiation factor-9* signaling is mediated by type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *J. Mol Endoc* 18: 653-655
- Nurhidayat. 2002. Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis: Deteksi bahan aktif dengan Metode Immunohistokimia. Institut Pertanian Bogor. 1-14.
- Poernomo, B., M. Mafruchati, Widjiati, E. M. Luqman , E. D. Masithah. 2000. Diktat Ilmu Mudigah. Lab Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Pennetier,S., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Papillier, P. Mermillod, and R. Dalbiès. 2004. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes *MATER*, *ZARI*, *GDF9*, *BMP15*, and *VASA* in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos. *J. Biol. Reprod*

- Rimayanti. 2005. Pengaruh Proses Vitrifikasi dengan Krioprotektan Etilen Glikol Terhadap Daya Hidup Oosit Sapi. *J Med Ked Hewan* Vol.21, No.1: 28-31.
- Sendai, Y., T. Itoh., S. Yamashita, H. Hoshi. 2001. Molecular cloning of a cDNA encoding a bovine *growth differentiation factor-9 (GDF-9)* and expression of GDF-9 in bovine ovarian oocytes and *in vitro*-produced embryos. *Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan.* 3(1):3-10.
- Sophie P., S. Uzbekova, C. Perreau, P. Pappilier, P. Mermillod, and Rozenn D. 2004. Spatio-Temporal Expression of the Germ Cell Marker Genes *MATER, ZAR 1, GDF-9, BMP-15, and VASA* in Adult Bovine Tissues, Oocytes, and Preimplantation Embryos 1. 71 : 1359-1366.
- Sou Y. Q., M. Nyegard, O. M .Toft. 2006. Participation of Mitogen-Activated Protein Kinase Hormone in Luteinizing Hormone-Induced Differential Regulation of Steroidogenesis and Steroidogenic Gene Expression in Mural and Cumulus Granulosa Cell of Preovulatory Follicles. 75 : 857-85.
- Spicer, L.J., P.Y. Aad, D. T. Aalen, S. Mazerbourg, A.H. Payne and A.J. Hsueh. . 2007. *Growth Differentiation Factor 9 (GDF9)* Stimulates Proliferation and Inhibits Steroidogenesis by Bovine Theca Cells: Influence of Follicle Size on Responses to GDF 9. *J. Biol Reprod.*63400 -63446
- Stephanie, A. P. and M. Matzuk. 2005. The Art and Artifact of GDF9 Activity: Cumulus Expansion and the Cumulus Expansion-Enabling Factor. *Biology of Reproduction.* 73; 582-585.
- Tamer S. H. and David A. 2005. Oocytes Prevent Cumulus Cell Apoptosis Maintaining a Morphogenetic Paracrine Gradient of Bone Morphogenetic Proteins. 5257-5267.
- Tomaszewka, M.W., I. K. Utama, I.G. Putu dan T. D. Chaniago. 1991. *Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia.* PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Vitt U.A., M.Hayashi, C. Klein, A.J.W. Hsueh. 2000. *Growth Differentiation Factor-9* Stimulates Proliferation but Suppresses the Follicle-Stimulating Hormone-Induced Differentiation of Cultured Granulosa Cells from Small Antral and Preovulatory Rat Follicles.*Biology of Reproduction.* 62; 370-377.
- Wasito R, 1997. Bioteknologi Kesehatan Hewan di Indonesia Wawasan Masa Depan. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar dalam Ilmu Patologi pada Fakultas Kedokteran Hewan UGM.

- Widjiati. 2007. Induksi Maturasi Oosit secara *In Vitro* oleh TGF- β asal Oosit Kumulus Kompleks [Disertasi]. Universitas Brawijaya. Malang.
- Widjiati dan Rimayanti. 2002. Seleksi ukuran folikel terhadap profil transformasi kromosom oosit kambing pada proses maturasi *in vitro*. Laporan Penelitian Dik Rutin Universitas Airlangga. Surabaya.
- Widjiati, Nur Z.H., Ismudiono dan Sukmanadi. 2008. Identifikasi Protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) yang Diisolasi dari Oosit pada Folikel Dominan Ovarium Sapi. *Veterinaria Medika* Vol.1 No.2. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.



LAMPIRAN

LAMPIRAN

Lampiran 1. Katalog GDF9 Antibody (N-Term)



GDF9 Antibody (N-term)

Purified Rabbit Polyclonal Antibody (Pab)

Animal ID: RB2235	Catalog #: AP2069a	Size: 0.1 mg
Source: Rabbit	Lot #: SH030124H	Concentration: 0.25 mg/ml

Background:

GDF9 is a member of the bone morphogenetic protein (BMP) family and the TGF-beta superfamily. This group of proteins is characterized by a polybasic proteolytic processing site which is cleaved to produce a mature protein containing seven conserved cysteine residues. The members of this family are regulators of cell growth and differentiation in both embryonic and adult tissues. Growth factors synthesized by ovarian somatic cells directly affect oocyte growth and function. GDF9 is expressed in oocytes and is thought to be required for ovarian folliculogenesis.

Accession : NP_005251

Molecular Weight: 51443 Da

Specificity:

Human: Positive

Applications:

The suggested dilution is:
 ELISA 1:1,000
 Western blotting 1:100-500
 Immunohistochemistry 1:50-100

Isotype: Rabbit Ig

Description: This antibody is generated from rabbits immunized with a KLH conjugated synthetic peptide (10-30 aa in length) at the N-term of first 60 aa of human GDF9.

Storage: Maintain refrigerated at 2-8°C for up to 6 months. For long term storage store at -20°C.

Format: Purified rabbit polyclonal antibody supplied in PBS with 0.09% (w/v) sodium azide. This antibody is purified through a protein G column and eluted out with both high and low pH buffers and neutralized immediately after elution then followed by dialysis against PBS.

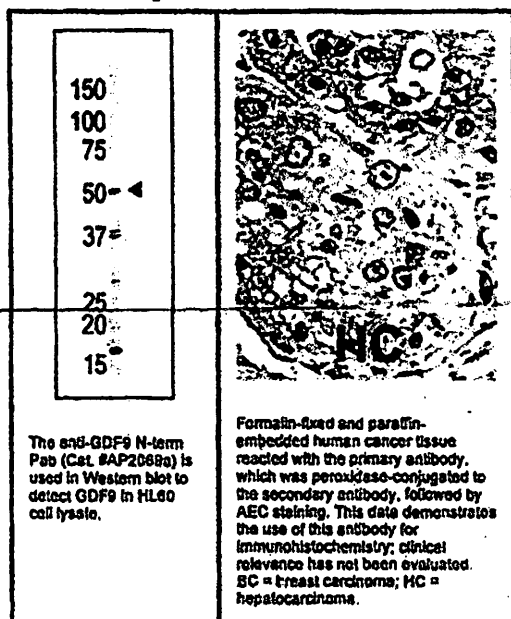
Precautions: This product is for research use only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures.

Related Products:

1. BP2069a: Blocking Peptide

Background References:

1. Liao, W.X., et al., J. Biol. Chem. 278(6):3713-3719 (2003).
2. Vitl, U.A., et al., Biol. Reprod. 67(2):473-480 (2002).
3. Aaltonen, J., et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 84 (8):2744-2750 (1999).
4. Dong, J., et al., Nature 383(6600):531-535 (1996).
5. McGrath, S.A., et al., Mol. Endocrinol. 9(1):131-136 (1995).

Western Blotting and IHC:

Lampiran 2. Komposisi media TCM dan PBS dalam 100 ml**TCM (100 ml)**

TCM Powder	0,95 g
NaHCO ₃	0,22 g
Gentamycin	10 µl/ml
DW	100 ml
BSA	0,003 g (dimasukkan terakhir dan tidak boleh diaduk atau digoyang)

PBS (100 ml)

PBS	100 ml
Antibiotik	1,0 µl/ml
BSA	0,003 g (dimasukkan terakhir dan tidak boleh diaduk atau digoyang)

Sumber : Widjiati, 2008

Lampiran 3. Prosedur Immunositokimia

Gelas obyek perlu dilapisi poly-L-lysine sebelum objek dilekatkan kemudian didiamkan beberapa menit.

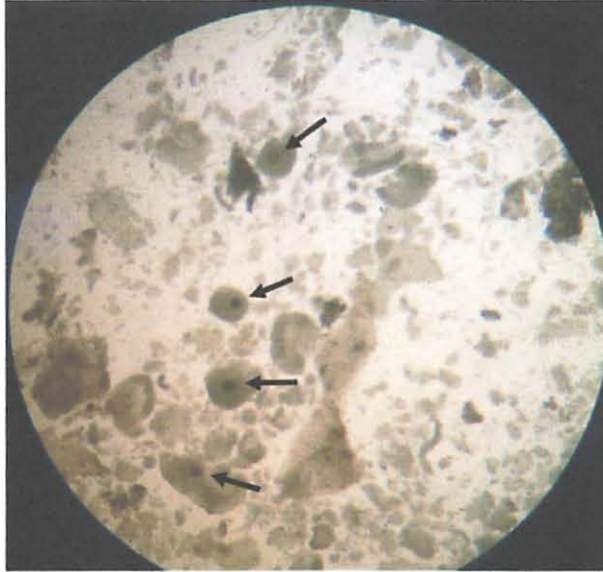
STAINING PROTOCOL

- PBS (10%) 2 kali @ 5 menit
- H₂O₂ 3% selama 10 menit
- PBS (10%) 2 kali @ 5 menit
- Antibodi primer diencerkan dengan diluent Ab 5% diteteskan pada objek, 45-60 menit
- PBS (10%) 2 kali @ 5 menit
- Biotinylated Link (yellow) drops selama 30 menit
- PBS (10%) 2 kali @ 5 menit
- Streptavidin (red) drops selama 30 menit
- PBS (10%) 2 kali @ 5 menit
- DAB (3,3'-diaminobenzidine) chromogen 6-10 menit (diencerkan dengan diluent 2%)
- PBS 5 menit
- Aquadest 5 menit

COUNTERSTAIN : - *Methylen green* 5-15 menit

Sumber: Laboratorium Patologi Veteriner Universitas Airlangga Surabaya

Lampiran 4. Foto-foto penelitian



Tanda panah menunjukkan oosit kumulus kompleks yang akan dikoleksi dan diidentifikasi dengan metode immunositokimia