

# SKRIPSI

## **IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 (GDF-9) YANG DIISOLASI DARI OOSIT PADA FOLIKEL DOMINAN OVARIUM SAPI**



Oleh :

**NUR ZAHROTUL HAYATI**

**NIM 060313208**

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2008**

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN  
*GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 (GDF-9)*  
YANG DIISOLASI DARI OOSIT PADA FOLIKEL  
DOMINAN OVARIUM SAPI**

**IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI PROTEIN  
*GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 (GDF-9)*  
YANG DIISOLASI DARI OOSIT PADA FOLIKEL  
DOMINAN OVARIUM SAPI**

Skripsi  
Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Sarjana Kedokteran Hewan  
Pada  
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh

NUR ZAHROTUL HAYATI  
NIM 060313208

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

(Prof. Dr. Ismudiono, M. S., Drh)  
Pembimbing Pertama

(Moh. Sukmanadi M. Kes., Drh)  
Pembimbing kedua

(Prof. Dr. Ismudiono, M. S., Drh)  
Pembimbing Pertama

(Moh. Sukmanadi M. Kes., Drh)  
Pembimbing kedua

## PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**Identifikasi dan karakterisasi protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi**

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, November 2007

Nur Zahrotul Hayati  
NIM 060313208

Telah dinilai pada seminar hasil penelitian

Tanggal : 04 Desember 2007

**KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN**

Ketua Penguji : Indah Norma Triana, M.Si., Drh

Sekretaris Penguji : Dr. Widjiati, M. Si., Drh

Anggota Penguji : Trilas Sardjito, M. Si., Drh

Pembimbing I : Prof. Ismudiono, M. S., Drh

Pembimbing II : Moh. Sukmanadi, M. Kes., Drh

Telah diuji pada

Tanggal : 04 Januari 2008

**KOMISI PENGUJI SKRIPSI**

**Ketua : Indah Norma Triana, M.Si., Drh**

**Anggota : Dr. Widjiati, M.Si., Drh**

**Trilas Sardjito, M.Si., Drh**

**Prof. Ismudiono, M.S., Drh**

**Moh. Sukmanadi, M.Kes., Drh**

**Surabaya, 07 Januari 2008**

**Fakultas Kedokteran Hewan**

**Universitas Airlangga**

**Dekan,**



**Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., Drh.**

**NIP. 130 687 305**

# **IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEIN *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9* (GDF-9) ISOLATED FROM OOCYTES DOMINANT FOLLICLES OF BOVINE OVUM**

Nur Zahrotul Hayati

## **ABSTRACT**

This research comprises a series of researches on protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) fraction in *in vitro* maturation process to improve the quality of oocytes as oocyte bank for *in vitro* embryo production. The research is aimed at identification and characterization of protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) isolated from oocytes dominant follicles of bovine ovum. Bovine ovary obtained from a slaughterhouse was aspired in its ovary follicles then extracted by sonication technique. Identification of protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) fraction was carried out by means of *Sodium Dodecyl Sulphonate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE). From the results of research, several protein fractions were obtained. Based on the calculation of regression equation resulting from protein marker to determine the molecular weight of *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) protein, 8 protein fractions were determined, they are : 146.46 kDa, 116.12 kDa, 101.02 kDa, 51.06 kDa, 39.94 kDa, 34.75 kDa, 31.67kDa, 15.07kDa. Protein appearing in the protein band the molecular weight of 51.06 kDa was identified as *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) protein fraction playing a role in follicle development.

**Keywords :** *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9), oocyte, dominant follicle

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur ke hadirat Allah S. W. T atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Identifikasi dan Karakterisasi Protein *Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)* yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi.**

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.

Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Prof. Dr. Ismudiono, M.S., Drh selaku pembimbing pertama dan Moh. Sukmanadi, M.Kes., Drh selaku pembimbing kedua, Epy M. Luqman. M.S., Drh selaku kepala proyek penelitian dan Dr. Widjiati, M.Si., Drh selaku dosen pembimbing penelitian sekaligus sekretaris penguji atas kesempatan mengikuti penelitian, kesabaran, saran, kritik, dan bimbingannya selama penelitian sampai selesainya skripsi penulis, Dr. Aulanni'am, M.Si., Drh dan mbak Ina atas bantuannya selama penelitian.

Kepada Indah Norma Triana M.Si., Drh selaku ketua penguji dan Trilas Sardjito M.Si., Drh selaku anggota penguji dan seluruh staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Kedua orang tuaku, Ir. H. A. Bambang Irawan E. S dan Ibu Yektiningsih, atas segala doa, pengorbanan, kasih sayang, bimbingan, kesabaran, dukungan dan nasehatnya selama ini, adik-adikku, budeku, Herina Edy Widjaja, SE, Akt, serta keluarga besar Mangunsari, Bendosari atas segala cinta dan dukungannya.

Kepada Afik, Bastian, David, Iffan, Hanif, Bulan, Renzzy, Lina, Mira, Maya, Vivi, K'Dudy, teman-teman kontrakan, dan teman-teman angkatan 2003 atas semua *unforgettable moment* serta kesediaannya membagi indahnya persahabatan selama ini.

Kepada Zaenal mustakim atas dorongan semangat serta bantuannya selama penelitian sampai selesainya skripsi ini, Teguh dan Anto yang juga bersama-sama penulis mengerjakan penelitian dari awal sampai akhir.

Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan makalah ini.

Penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharap kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan makalah ini. Supaya penelitian ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu kedokteran hewan di Indonesia pada khususnya dan masyarakat luas pada umumnya.

Akhirnya penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya.

Surabaya, Januari 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR SINGKATAN.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Landasan atau Dasar Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Hasil Penelitian.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Sistem Reproduksi Betina.....	6
2.2 Ovarium.....	7
2.2 Folikulogenesis.....	8
2.3 <i>Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)</i> .....	12
2.4 Elektrofesis <i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)</i> .....	13
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	17
3.1 Tempat Penelitian dan Waktu Penelitian.....	17
3.2 Materi Penelitian.....	17
3.2.1 Bahan Penelitian.....	17
3.2.2 Alat-alat Penelitian.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	18
3.3.1 Persiapan bahan.....	18
3.3.2 Persiapan sampel oosit.....	18
3.3.3 Prosedur penelitian.....	18
3.3.3.1 Koleksi oosit.....	18
3.3.3.2 Isolasi fraksi protein yang didapat dari dominan folikel Sapi.....	19
3.3.3.3 Pemeriksaan profil protein <i>Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)</i> dengan metode elektrofesis SDS-PAGE.....	20
3.3.3.4 Tahap Pencucian dan Pewarnaan.....	21
3.3.4 Kerangka penelitian.....	22

BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	23
BAB 5 PEMBAHASAN.....	25
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
6.1 Kesimpulan.....	29
6.2 Saran.....	29
RINGKASAN.....	30
DAFTAR PUSTAKA .....	33
LAMPIRAN.....	36

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Perubahan pada periode preantral folikulogenesis.....	11
3.1 Oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi.....	19
3.2 Bagan Penelitian.....	22
4.1 Hasil analisis protein dengan metode SDS-PAGE.....	23

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Penghitungan Berat Molekul pita protein .....	36
2. Alur SDS-PAGE.....	39
3. Bahan-bahan SDS-PAGE.....	40
4. Karakterisasi protein dengan SDS-PAGE.....	42
5. Alat dan bahan Fertilisasi <i>In Vitro</i> .....	45

### DAFTAR SINGKATAN

APS	: Amonium Persulphate
BM	: Berat molekul
BMP's	: Bone Morphogenetic Protein
BSA	: Bovine Serum Albumine
cAMP	: Cyclic Adenosine Monophosphate
DNA	: Deoxcyribo Nucleid Acid
fpO	: Fraksi Protein Oosit
GDF-9	: Growth Differentiation Factor-9
LH	: Luteinizing Hormone
MIS	: Mullerian Inhibitory Substance
PBS	: Phospat Buffer Saline
PBST	: Phospate Buffer Saline Tween
PMSF	: Phenyl Metil Sulfonil Flouride
Rf	: Retardation Factor
RPH	: Rumah Potong Hewan
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide gel electroforesis
TEMED	: Tetrametilendiamina
TGF- $\beta$	: Transforming Growth Factor- $\beta$
UV	: ultra violet

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tikus yang kekurangan GDF-9 menjadi infertil karena adanya suatu hambatan pada saat perkembangan folikel primer yang mengakibatkan kesalahan pada proliferasi dan diferensiasi sel granulosa. GDF-9 merupakan protein yang mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis *Deoxyribo Nucleid Acid* (DNA) pada membran sel granulosa dan proses penurunan *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) sehingga proses meiosis dapat berlangsung (Vitt *et al.*, 2000a).

GDF-9 merupakan protein yang dikarakterisasi oleh *polybasic proteolytic processing site*. *Polybasic proteolytic processing site* mempunyai kandungan protein matang yang mengandung 7 residu sistein yang merupakan reseptor dari GDF-9. GDF-9 juga berfungsi sebagai regulator pada pertumbuhan dan diferensiasi pada jaringan embrional maupun jaringan dewasa. GDF-9 disintesis oleh sel somatik ovum yang secara langsung mempunyai peran pada pertumbuhan dan fungsi oosit. Keberadaan dan peran GDF-9 pada oosit sangat dibutuhkan pada proses maturasi dan folikulogenesis ovarium (Abcam. 2007).

Pentingnya mengetahui karakter protein GDF-9 pada folikel dominan ovarium sapi erat kaitannya dengan proses maturasi oosit karena GDF-9 mempengaruhi perubahan *cumulus* dan peningkatan produksi androgen pada sel teka juga produksi inhibin pada sel granulosa (Jayawardana *et al.*, 2006). Oleh karena itu, dengan mengetahui karakter dari GDF-9 diharapkan dapat mengetahui fungsi dan perannya dalam proses maturasi oosit sehingga dapat diketahui peranannya dalam meningkatkan kualitas dan kuantitas oosit sebagai bank oosit untuk sumber produksi embrio yang dihasilkan secara *in vitro*. Juga diharapkan

dapat meningkatkan kualitas blastosis yang dihasilkan sehingga dapat memperbaiki perkembangan embrional selanjutnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan dalam penelitian ini adalah bagaimana karakter protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi?

## 1.3 Landasan Teori

Kualitas produksi embrio sapi secara *in vitro* baik di tingkat nasional maupun internasional masih cukup rendah. Hal ini terlihat dari angka kebuntingan apabila embrio yang dihasilkan secara *in vitro* ditransfer ke resipien. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa produksi embrio *in vitro* tahap blastosis pada sapi sekitar 30-40% dan domba sekitar 36% sedangkan pada kambing hanya 11% (Boediono *dkk.*, 1999).

Salah satu faktor yang ikut mempengaruhi rendahnya produksi embrio adalah populasi oosit yang dimaturasi sangat heterogen sehingga proses pematangan akhir tidak berjalan dengan sempurna (Hytell *et al.*, 1997; Greeve *et al.*, 1987; Kim *et al.*, 2000)

Keberadaan faktor-faktor oosit dapat meningkatkan proliferasi sel granulosa, sehingga memungkinkan terjadinya ekspansi *cumulus*. Meski demikian, sifat faktor-faktor oosit dalam menstimulasi proliferasi sel granulosa

secara mendalam belum banyak dikaji. Perkembangan ovarium mamalia ditandai oleh perkembangan folikel primordial. Folikel berkembang menjadi folikel primer, sekunder dan selanjutnya menjadi folikel antral. Selama proses folikulogenesis, perubahan ini diregulasi oleh hormon endokrin dan faktor parakrin. Selain itu, proliferasi sel granulosa dan diferensiasinya juga bisa dipengaruhi oleh faktor-faktor oosit karena sel granulosa dalam folikel antral yang sudah sempurna menunjukkan beberapa fenotipe yang berlainan sesuai dengan jaraknya dari oosit (Widjiati, 2007).

Selain menggunakan hormon-hormon, beberapa *Growth Factor* juga diperlukan untuk merangsang folikel ovarium. Penambahan *Growth Factor* ke media pematangan dan media pembiakan dapat meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel (Margawati, 1994).

Proliferasi dan diferensiasi sel granulosa ovum dipengaruhi oleh *Gonadotropin* sama banyak dengan parakrin yang disekresi oleh oosit dan sel somatik yang mengelilinginya. Faktor parakrin termasuk di dalamnya anggota dari superfamili TGF- $\beta$  yang juga merupakan *Growth Factor* derivat oosit yaitu GDF-9, berbeda dengan banyak anggota superfamili TGF- $\beta$  lainnya yang sudah terlihat jelas peran dan fungsinya pada sel somatik ovum, peran GDF-9 hanya terbatas pada saat perkembangan folikel primer dan folikel besar atau folikel antral (Mazerbourg *et al.*, 2003).

Peran GDF-9 sebagai stimulator pada saat perkembangan folikel primer dan fungsi GDF-9 pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel antral dan folikel preantral telah terbukti dalam beberapa penelitian. Dengan penambahan

GDF-9 terlihat adanya laju pertumbuhan folikel primer dan folikel preantral pada saat *in vitro* dan *in vivo*. Kemungkinan berubahnya *cumulus* dan peningkatan produksi androgen pada sel teka juga mungkin terjadi sebagaimana sel granulosa merangsang produksi inhibin. GDF-9 juga mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis DNA sel granulosa dan proses steroidogenesis (Jayawardana *et al.*, 2006).

#### 1.4 Tujuan Penelitian

Adapun penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi.

#### 1.5 Manfaat Hasil Penelitian

Manfaat yang diperoleh setelah dilakukan penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi ilmiah tentang adanya fraksi protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi yang berperan dalam perkembangan oosit sapi.
2. Rangkaian penelitian ini selanjutnya diharapkan dapat mengungkap peran *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) pada proses proliferasi dan diferensiasi oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi.

berhubungan dengan ligamen ingunal yang homolog dengan gubernakulum testis. Bagian lain ligamen ini membentuk ligamen bulat pada uterus yang kemudian meleburkan diri dari uterus ke daerah inguinal (Poernomo dkk., 2004).

## 2.2 Ovarium

Ovarium adalah salah satu organ yang berfungsi menghasilkan ovum dan hormon yang mengatur saluran reproduksi dan sifat-sifat seks sekunder, persiapan reaksi perkawinan serta memberikan pengaruh metabolik lainnya. Baik fungsi gametogenik maupun endokrin bukan merupakan proses yang terus-menerus, proses tersebut berfluktuasi secara berirama dalam kurun waktu tertentu. Perubahan-perubahan berkala dalam saluran kelamin ditentukan oleh variasi siklik pada kelenjar pituitari dan ovari (Turner dan Bagnara, 1988).

Pada mamalia, ovarium adalah alat kelamin betina yang bertanggung jawab pada diferensiasi dan pelepasan oosit pada fertilisasi, serta keberhasilan suatu perkembangbiakan dari spesies. Ovarium merupakan organ endokrin yang menghasilkan steroid untuk pengembangan karakteristik seksual sekunder betina dan mendukung kebuntingan. Ovarium sapi berbentuk ovoid dan berukuran kurang lebih 4 x 2 x 1.5 cm (Dyce *et al.*, 1987).

Ovarium terdiri dari *medulla* dan *cortex*, dikelilingi oleh epitel kecambah dan pada umumnya bertambah berat 4 sampai 7 kali berat sewaktu lahir pada waktu hewan menjelang pubertas. *Medulla ovarii* terdiri dari jaringan ikat fibrioe-elastik yang tidak teratur, dan sistem syaraf dan pembuluh darah yang memasuki ovarium melalui *hilus* (pertautan antara ovarium dan mesovarium). *Cortex*

mengandung folikel-folikel ovarium, dan merupakan tempat pembentukan ovum dan hormon. Jaringan ikat *cortex* mengandung banyak fibroblast, beberapa kolagen dan serabut-serabut retikuler, buluh-buluh darah, lymphe, syaraf dan serabut-serabut otot. Sel-sel jaringan ikat dengan permukaan tersusun sejajar dengan permukaan ovarium dan agak lebih padat daripada sel-sel yang terletak ke arah *medulla*. Lapisan padat ini dikenal sebagai *tunica albugenia*. Pada permukaan ovarium terdapat selapis sel-sel datar yang disebut epitel kecambah (*germinal epithelium*) (Toelihere, 1985).

### 2.3 Folikulogenesis

Folikulogenesis adalah rangkaian urutan kejadian dari tahap-tahap pendewasaan dan diferensiasi baik pada sel somatik maupun *germ cells* dan mencapai puncaknya pada produksi oosit dan mampu melakukan fertilisasi dan memenuhi kebutuhan selama fase perkembangan embrional (Glister *et al.*, 2003).

Di samping epitel permukaan, tiga sub unit fungsional ovarium adalah *folikel*, *korpus luteum*, dan *stroma*. Folikel berproliferasi secara mitosis (Turner dan Bagnara, 1988). Folikel yang sedang tumbuh segera diselubungi oleh lapisan jaringan berasal dari *stroma*. Pertumbuhan dan pematangan folikel itu berdasarkan daur yang konstan dan kejadiannya secara berkala (Yatim, 1994).

Folikel primer oositnya membesar, sel folikel jadi kubus atau batang, lalu mitosis berulang-ulang membentuk sel-sel granulosa yang terdiri dari beberapa lapis. Ada pigment lipokrom dalam ooplasma, banyak butir lemak, banyak ribosom bebas. Oosit membentuk mikrovili sedangkan sel granulosa (sel folikel)

yang meliputi membentuk filopodia, tonjolan-tonjolan halus yang panjang ke arah oosit. Oosit dan sel granulosa sebelah luarnya kemudian membentuk zona pelusida, selaput oosit yang terdiri dari bahan amorf dan tak mengandung sel sama sekali. Mikrovili dan filopodia berinterdigitasi dalam zona pelusida itu. Filopodia jauh lebih panjang dan dapat mencapai membran oosit. Filopodia itu sebagai penyalur bahan nutrisi dari tubuh induk (ovarium) ke oosit. Sementara itu, sel *stroma* membentuk diri jadi *theca folliculi* (kulit folikel), yang kemudian banyak dimasuki pembuluh darah dan membuat plexus. *Theca* kemudian terbagi dua : *theca interna* sebelah dalam, *theca externa* sebelah luar. Yang dalam selnya menggetahkan, yang luar mengandung jaringan ikat. Oosit primer menempuh meiosis I sampai tahap *Leptopen profase* (Yatim, 1994).

Sel-sel *theca interna* dipisahkan dari sel-sel granulosa folikel oleh membran propria. Sel-sel *theca interna* memegang peranan penting dalam sekresi hormon estrogen dan pembentukan korpus luteum sesudah ovulasi. Folikel primer berdiameter 40  $\mu\text{m}$ , dikelilingi oleh membran basal dan terletak di bagian luar korteks si bawah epitel permukaan. Folikel primer mengandung oosit dengan diameter  $\pm 30\mu\text{m}$  yang dikelilingi oleh sel-sel granulosa berbentuk kubus. Folikel primer mempunyai ciri khusus yaitu bahwa oosit yang terdapat di dalamnya tidak memiliki membran vitellin (Ismudiono, 1999).

Folikel sekunder oositnya mencapai besar maksimal dan letaknya eksentrik dalam folikel. Meiosis I sampai pada tahap *diplothen profase*. Sel granulosa terdiri dari 6 – 12 lapis sel (Yatim, 1994). Tidak semua folikel primer berubah menjadi folikel sekunder, tetapi hanya sebagian saja. Folikel sekunder

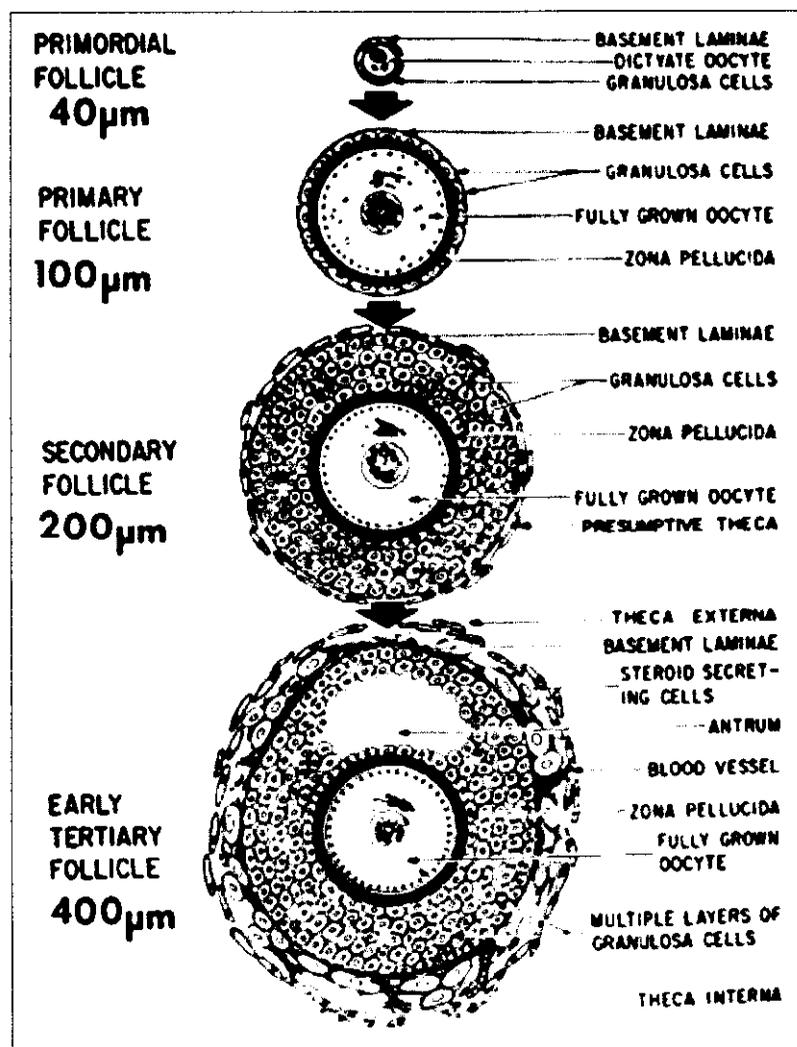
mengandung dua lapis sel-sel granulosa dan oosit berdiameter antara 50 $\mu$ m sampai 60 $\mu$ m. Folikel sekunder ditandai oleh berkembangnya 3 $\mu$ m sampai 5 $\mu$ m lapis glikoprotein tebal disebut zona pelusida yang mengitari membran plasma oosit. Terdapat penetrasi parsial di daerah ini oleh mikrofil permukaan oosit. Zona pelusida dihasilkan oleh sel-sel granulosa yang langsung mengitari oosit dan sebagian oosit itu sendiri (Dellmann dan Brown, 1992; Mayes, 2002).

Folikel tertier terjadi pada saat terbentuk rongga dalam folikel, disebut *antrum*. Rongga itu berisi cairan *liquor folliculi*. Diameter folikel 10mm (Yatim, 1994). Folikel sekunder menjadi folikel tersier ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulosa sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan. Folikel tersier atau disebut juga folikel antral ditandai dengan adanya rongga yang disebut antrum. Antrum adalah rongga yang berisi cairan folikel. Oosit primer pada folikel tersier berdiameter 150 $\mu$ m sampai 300  $\mu$ m tergantung pada spesies. Bentuknya bulat, inti terletak di tengah dengan jalinan kromatin tipis dan nukleus jelas (Dellmann dan Brown, 1992; Mayes, 2002).

Folikel *de Graaf* oositnya diselaputi beberapa lapis sel granulosa berada dalam suatu tonjolan ke dalam antrum, disebut *cumulus oophorus*. Kalau terjadi ovulasi, tonjolan ini yang lepas keluar ovarium, dan sel granulosa sekeliling oosit disebut *corona radiata*. Oosit kini disebut ovum, meski meiosis II belum diselesaikan. Polosit I yang terbentuk akhir meiosis I berada di luar oosit, sebelah dalam zona pelusida. Meiosis II diselesaikan kalau ovum dibuahi (Yatim, 1994). Folikel *de Graaf* berkembang terus diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum, pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormon estrogen yang dihasilkan

oleh sel teka. Sel teka akan merangsang pelepasan *Luteinizing Hormone* (LH) dan sekresi LH ini akan menggertak terjadinya ovulasi. Saat ini terjadi pelepasan *polar body 1* dan ovum memasuki pembelahan meiosis II (Hafez, 2000).

Menurut Ismudiono, 1999, yang dikutip dari Meirio, 2006, selama folikel mengalami perkembangan, ovum tetap berada pada tingkat awal pembelahan heterotipe. Menjelang ovulasi, bila sel cumulus telah terlepas, mulailah tingkat akhir pendewasaan ovum.



Gambar 2.1 Perubahan pada periode preantral folikulogenesis (Erickson, Gregory F. Normal ovarian function. Clin Obstet Gynecol 21:31, 1978)

### 2.3 *Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9)*

GDF-9 adalah suatu glikoprotein yang termasuk dalam superfamili dari TGF- $\beta$  yang disekresi dari oosit dengan berat molekul 51kDa (Abcam. 2007). GDF-9 merupakan faktor diferensiasi dan pertumbuhan sama seperti faktor tumbuh kembang lainnya yaitu TGF- $\beta$ , *Mullerian Inhibitory Substance (MIS)*, *Activin* dan *Inhibin*, juga termasuk *Bone Morphogenetic Protein (BMP's)* (Mazerbourg *et al.*, 2003).

GDF-9 ditemukan pertama kali pada awal tahun 1990 sebagai anggota TGF- $\beta$ . Ditemukan pada rodentia (McPherron & Lee 1993, Hayashi *et al.*, 1999), pada sapi dan kambing (Bodensteiner *et al.*, 1999), pada manusia (Aaltonen *et al.*, 1999), dan juga pada ovarium babi (Shimizu *et al.*, 2004b).

GDF-9 mempengaruhi berbagai sel ovari termasuk sintesis DNA pada membran sel granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung. Seperti ligan-ligan family TGF- $\beta$  lainnya, ligan GDF-9 diketahui berhubungan dengan reseptor serine/threonine kinase. GDF-9 mempunyai kemampuan untuk merangsang proliferasi sel granulosa dan menghambat diferensiasinya. Kekurangan GDF-9 akan menyebabkan perkembangan folikel terhenti, tidak adanya lapisan sel teka di sekeliling folikel, serta berkurangnya kemampuan pembelahan meiosis pada oosit (Vitt *et al.*, 2000a).

GDF-9 sangat dibutuhkan pada fertilitas tikus putih betina, tetapi tidak pada yang jantan. GDF-9 juga berperan pada folikel primer sampai pada saat

ovulasi oosit. Tikus putih betina yang kekurangan GDF-9 menjadi infertil karena adanya hambatan pada tahap pembentukan folikel primer, yang mengakibatkan hambatan pada saat pertumbuhan dan diferensiasi sel granulosa, penyusunan sel teka, dan juga kemampuan pembelahan meiosis oosit (Elvin *et al.*, 2000).

Banyak penelitian membuktikan pentingnya peran GDF-9 sebagai stimulator pada saat perkembangan folikel primer serta peran dan fungsi GDF-9 pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel antral dan folikel preantral. Dengan penambahan GDF-9 terlihat adanya laju pertumbuhan folikel primer dan folikel preantral pada saat *in vitro* dan *in vivo*. Kemungkinan berubahnya *cumulus* dan peningkatan produksi androgen pada sel teka juga mungkin terjadi sebagaimana sel granulosa merangsang produksi inhibin. GDF-9 juga mempengaruhi berbagai fungsi sel ovarium termasuk sintesis DNA sel granulosa dan proses steroidogenesis (Jayawardana *et al.*, 2006).

Kerja biologis GDF-9 diperantarai oleh reseptor tipe I dan II bersama dengan kerja serine/threonine kinase yang diikuti dengan faktor phosphorylasi intrasel yang dinamakan Smads (Mazerbourgh *et al.*, 2003).

#### **2.4 Elektroforesis Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electroforesis (SDS-PAGE)**

Metode elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekul. Istilah elektroforesis menggambarkan migrasi muatan partikel dibawah pengaruh medan listrik. *Electro* berarti energi listrik, *phoresis* berasal dari bahasa Yunani yaitu phoros yang berarti melintasi. Elektroforesis

adalah gerakan partikel (koloid) yang bermuatan listrik melalui suatu gel karena pengaruh medan listrik. Pergerakan molekul pada suatu medan listrik dipengaruhi oleh ukuran, bentuk, muatan, dan sifat biologi dan kimia molekul tersebut. *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) adalah deterjen. SDS akan menyelimuti protein pada saat terjadi pemanasan dan denaturasi semua protein akan dilindungi oleh SDS sehingga menjadi tidak bermuatan. Semua protein akan bergerak dengan kecepatan yang sama kecuali pada pori yang lebih kecil, yang menyebabkan penghambatan aliran dan perlu diingat bahwa protein dalam hal ini terseparasi bukan berdasarkan muatan tetapi berdasarkan ukuran. *Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide gel electroforesis* (SDS-PAGE) umumnya dipakai di laboratorium biokimia dan digunakan untuk melakukan konfirmasi hasil pemurnian protein (Aulanni'am, 2004).

*Polyacrilamide gel electroforesis* (PAGE) adalah standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit, dan kemurnian protein. Protein adalah molekul yang bersifat amfoterik karena mengandung kedua grup dengan muatan berlainan yaitu grup karboksil negatif dan grup amino positif. *Isoelectric point* (pI) adalah suatu titik pada protein yang tidak bermuatan listrik. Ada 2 (dua) sistem pada SDS-PAGE yaitu kontinyu (Weber dan Osbon) dan diskontinyu (Laemmli). Pada sistem kontinyu, campuran protein dimasukkan pada bagian atas (*Separating gel*), hal ini menyebabkan terjadinya resolusi dengan sampel. Sedangkan pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis tipis berupa pita atau band yang tipis (Rantam, 2003).

Pada SDS-PAGE digunakan SDS dan  $\beta$ -merkaptoetanol. SDS merupakan detergen anionik yang bersama dengan  $\beta$ -merkaptoetanol sebagai agen pereduksi, ditambah dengan pemanasan menyebabkan rusaknya struktur tiga dimensi protein menjadi konfigurasi "random coil". Hal ini disebabkan terpecahnya ikatan disulfida yang selanjutnya tereduksi menjadi gugus sulfhidril. Medium pendukung ideal untuk elektroforesis adalah bahan kimia inert (tidak bermuatan listrik), mudah ditangani dan mempunyai daya serap yang baik. Medium elektroforesis mempunyai efek langsung dalam pemisahannya. Jika ukuran pori kira-kira sama dengan molekul maka molekul yang lebih kecil akan berpindah lebih bebas di medan listrik, sedangkan molekul yang lebih besar akan dibatasi migrasinya (Aulanni'am, 2004).

Tiga jenis gel yang umum digunakan adalah kanji, poliakrilamid dan agarosa (Patel *et al.*, 1994). Gel poliakrilamida merupakan medium yang secara kimiawi bersifat inert. Gel ini lebih menguntungkan daripada gel pati karena gel poliakrilamida bersifat transparan sehingga dapat discan memakai sinar tampak maupun *Ultra Violet* (UV). Selain itu, ukuran pori gel poliakrilamida dapat diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik (Scopes *et al.*, 1987).

Awal terjadinya polimerasi pada gel poliakrilamida adalah ketika amonium persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) membentuk radikal bebas jika dilarutkan di dalam air kemudian radikal bebas ini bereaksi dengan *acrylamid* sehingga membentuk *acryl* aktif. Molekul *acrylamid* aktif ini bereaksi dengan molekul *acryl* yang lain sehingga akan dihasilkan rantai polimer yang panjang. Pembentukan gel ini memerlukan *bis-acrylamid* sebagai pembentuk ikatan silang

(*cross linking agent*) dan dikatalisa oleh N,N,N,N tetramethylenediamine (TEMED) (Rantam, 2003).

## **BAB 3**

# MATERI DAN METODE

## **BAB 3 MATERI DAN METODE**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu pada bulan Juli – Oktober 2007 di dua laboratorium yaitu di laboratorium Fertilisasi *In Vitro* (FIV) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (FKH UNAIR) Surabaya dan Laboratorium Biokimia Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya (FMIPA UNIBRAW) Malang.

### **3.2 Materi Penelitian**

#### **3.2.1 Bahan Penelitian**

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari limbah Rumah Potong Hewan (RPH).

Bahan kimia yang diperlukan antara lain adalah : Alkohol, NaCl fisiologis, Aquabidest, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *Bovine Serum Albumine* (BSA), Gentamycin Sulfate.

#### **3.2.2 Alat-alat Penelitian**

Alat yang digunakan untuk penelitian ini antara lain adalah : Gunting (Merk Tajimaco S. S), Pinset (Merk Tajimaco S. S), Spuite disposable 5 cc (Merk One med), Jarum ukuran G20, Cawan petri disposable (Merk Falcon), Erlenmeyer, Pipet Pasteur, Pipet endorff, Tabung endorff, Alat centrifuge (Merk Medifuge) , Freezer, Incubator CO, Gelas Ukur, Mikroskop Inverted (Merk

Meiji), Refrigerator, Ultrasonic Homogenizer (Merk Memmert), Elektroforesis, Elektro buffer.

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Persiapan Bahan**

Media yang digunakan untuk koleksi sel-sel oosit dalam penelitian ini adalah media PBS.

#### **3.3.2 Persiapan sampel oosit (Ovarium)**

Ovarium sapi diperoleh dari RPH yang sebelumnya dibersihkan dulu dari organ-organ yang melekat termasuk darah dan lemak kemudian dimasukkan ke dalam botol yang berisi NaCl fisiologis kemudian dimasukkan ke dalam termos yang diisi air hangat.

#### **3.3.3 Prosedur Penelitian**

##### **3.3.3.1 Koleksi oosit**

Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH tersebut dicuci terlebih dahulu sebanyak tiga kali pencucian dengan NaCl 0.9%, kemudian direndam dengan menggunakan NaCl 0.9% yang ditambahkan Gentamysin sulfate. Kemudian pada ovarium tersebut dilakukan aspirasi pada folikel dominannya dengan diameter  $\pm > 10\text{mm}$  (lihat Lampiran 5). Digunakan jarum ukuran G20 yang dihubungkan dengan spuit 5 ml berisi 1 ml PBS yang telah diberi tambahan BSA dan Gentamysin. Aspirasi oosit dilakukan kemudian dimasukkan ke dalam tabung

ependorff yang kemudian diberi label dan disimpan di dalam freezer. Pada penelitian ini protein akan diambil dari oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi. (Lihat Gambar 3.1)



Gambar 3. 1 Oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi

### 3.3.3.2 Isolasi fraksi protein oosit yang didapat dari folikel dominan ovarium sapi

Isolasi protein yang dilakukan adalah sebagai berikut : sampel oosit yang telah dikoleksi diambil sebanyak 200 $\mu$ L ditambah larutan *Phospate Buffer Saline Tween* (PBST) yang mengandung 0.05 mM *Phenyl Metil Sulfonyl Flouride* (PMSF) sampai lima kali volume sampel yang berfungsi sebagai antibiotik. Sampel oosit yang telah diencerkan kemudian dilakukan sonikasi selama 10 menit

yang berfungsi untuk memecah dinding sel dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan antara endapan dan supernatan. Supernatan yang dihasilkan ditambahkan etanol absolut dengan perbandingan 1:1 yang berfungsi untuk mengendapkan protein, kemudian dimasukkan ke dalam refrigerator selama 12 jam atau overnite. Selanjutnya disentrifugasi 6000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit untuk memisahkan endapan dan supernatan. Endapan yang diperoleh dimasukkan ke dalam freezer selama lima menit. Endapan yang dihasilkan tersebut kemudian ditambah Tris Cl 50µL dan disimpan di freezer sebelum digunakan sebagai bahan isolat fpO (Fraksi Protein Oosit).

### **3.3.3.3 Pemeriksaan profil protein *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) pada oosit yang dikoleksi dari folikel dominan ovarium sapi dengan metode Elektroforesis SDS-PAGE**

Setelah didapatkan fraksi protein yang berasal dari oosit, selanjutnya menyiapkan *separating gel* pada alat SDS-PAGE yaitu memasukkan larutan gel ke dalam alat pembentuk gel menggunakan pipet. Bahan-bahan yang digunakan dapat dilihat di lampiran 3. Setelah gel membeku, tambahkan *stacking gel* dan masukkan *comb* dan tunggu kurang lebih 30 menit. Selanjutnya keluarkan *comb*.

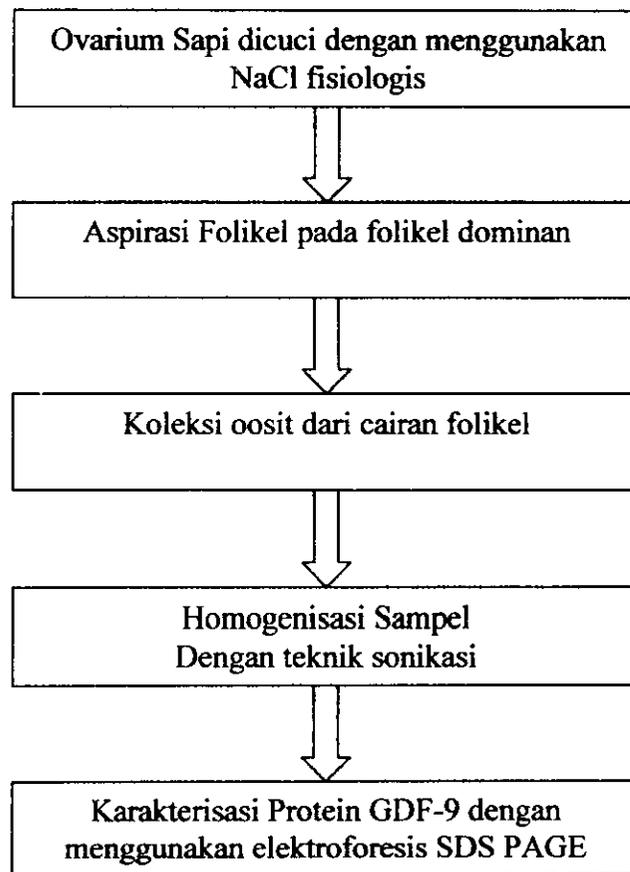
Sampel protein sebanyak 10-20 µl dimasukkan ke dalam lubang cetakan pada *stacking gel*. Selanjutnya *plate* yang telah berisi sampel dimasukkan ke alat Bio-Rad (Seperangkat alat gel elektroforesis) dan anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas. Power supply dihidupkan dengan arus listrik sebesar 130V, 30mA. Proses pemisahan (*running*)

dihentikan setelah warna biru dari penanda mencapai ketinggian  $\pm 0.5$  cm dari batas bawah *plate* gel kemudian *running buffer* dituang dan gel diambil dari *plate* (lihat Lampiran 4).

#### **3.3.3.4 Tahap Pencucian dan Pewarnaan**

Tahap pencucian dan pewarnaan yang dilakukan dengan menggunakan larutan *staining* untuk pewarnaan dan *destaining* untuk pencucian sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih. Kemudian hasil elektroforesis difoto atau di scan.

### 3.3.4. Kerangka Penelitian



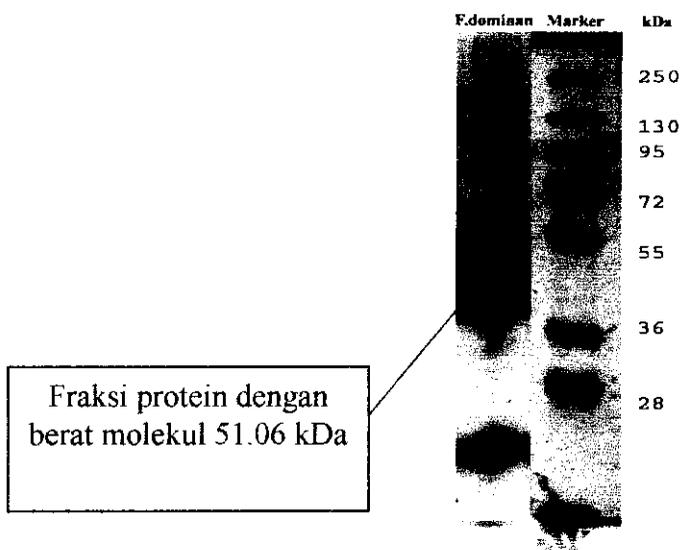
Gambar 3.2 Bagan Penelitian

## **BAB 4**

# HASIL PENELITIAN

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

Penelitian untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein GDF-9, dilakukan analisis dengan menggunakan tehnik SDS-PAGE sehingga didapatkan hasil yang dinyatakan dalam satuan berat molekul yaitu kDa. Hasil SDS-PAGE ditampilkan dengan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue R-250* (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Hasil analisis protein dengan metode SDS-PAGE

Berdasarkan penghitungan persamaan regresi dari marker protein untuk menentukan berat molekul protein GDF-9 diketahui 8 fraksi protein yaitu : 146.46 kDa, 116.12 kDa, 101.02 kDa, 51.06 kDa, 39.94 kDa, 34.75 kDa, 31.67kDa, 15.07 kDa. Menurut Aulanni'am (2004), penentuan berat molekul (BM) dilakukan dengan bantuan protein standar (marker). Untuk menentukan berat molekul protein dilakukan dengan menghitung nilai *Retardation Factor* (Rf) dari masing-masing pita, dengan rumus :

$$R_f = \frac{\text{Jarak Pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Penghitungan berat molekul dari pita-pita protein (Gambar 4.1) yang terdapat pada gel dilakukan dengan jalan membandingkan antara berat molekul dari marker dengan  $R_f$ . Selanjutnya dibuat kurva standar dengan nilai  $R_f$  sebagai sumbu x dan nilai logaritma berat molekul sebagai sumbu y.

Berdasarkan penghitungan antara BM dan  $R_f$  dengan menggunakan regresi linear, sehingga diperoleh persamaan :  $Y = 2.4477 - 1.3905x$

X adalah nilai  $R_f$ , sedang Y adalah nilai logaritma massa molekul relatif (Mr).

Penghitungan berat molekul masing-masing sampel didapat dari **anti-log Y** yang sebelumnya nilai  $R_f$  sampel dikonversikan ke dalam persamaan regresi linear.

(Penghitungan dapat dilihat pada Lampiran 1).

Hasil yang didapat dari penghitungan, maka pita protein dengan Berat Molekul 51.06 kDa diasumsikan sebagai protein GDF-9 yang berasal dari oosit yang diisolasi dari folikel dominan pada ovarium sapi.

## **BAB 5**

# PEMBAHASAN

## BAB 5 PEMBAHASAN

Pada penelitian ini telah dilakukan karakterisasi protein GDF-9 dengan menggunakan metode SDS-PAGE yang merupakan standar metode pengujian terhadap berat molekul protein, struktur sub unit dan kemurnian protein. Teknik ini lazim digunakan karena sederhana, murah, sampel yang digunakan relatif sedikit (Rantam, 2003).

SDS-PAGE adalah salah satu cara elektroforesis yang digunakan untuk memisahkan protein. Ukuran pori dan muatan molekul memainkan peran dalam proses pemisahan. Pada metode ini digunakan SDS. SDS digunakan untuk menyelimuti protein, sehingga pada saat pemanasan dan terjadi denaturasi semua protein akan terlindungi sehingga menjadi tidak bermuatan (Aulanni'am 2004).

Prinsip dasar metode SDS-PAGE ini adalah elektroforesis protein dalam detergen ionic yaitu SDS. Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dari bagian belakang peptida, salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian, protein SDS kompleks migrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya tetapi tidak spesifik terhadap jenis protein tertentu. Medium pendukung yang digunakan untuk elektroforesis dalam penelitian ini adalah PAGE. Gel poliakrilamid merupakan medium yang secara kimiawi bersifat inert. Gel ini lebih menguntungkan daripada gel lainnya seperti gel pati, karena gel poliakrilamid bersifat transparan sehingga dapat discan memakai sinar tampak ataupun *ultra violet* (UV). Gel poliakrilamid menguntungkan karena ukuran pori dan tingkat penyaringan molekulnya dapat

diatur untuk menghasilkan separasi yang lebih baik. Poliakrilamid dapat diatur dengan mengatur perbandingan antara akrilamid dan bisakrilamidnya (Rantam, 2003).

Komposisi matrik gel dapat diubah-ubah sesuai kemauan. Jika akan menganalisa suatu sampel dengan berat BM besar, maka sebaiknya digunakan kadar akrilamid yang kecil. Hal ini untuk mendapatkan kolom gel yang pendek. Sebaliknya untuk menganalisa sampel dengan BM kecil maka dapat digunakan kadar akrilamid yang besar. Untuk menentukan besar-kecilnya pori gel dapat diatur dengan cara mengubah kadar bisakrilamidnya. Jika yang diinginkan memisahkan molekul yang besar, maka dapat digunakan kadar bisakrilamid yang rendah.

Zat lain yang digunakan dalam elektroforesis adalah TEMED (Tetrametilendiamina) sebagai inisiator terjadinya polimerasi, dan APS (*Amoniumm Persulphate*) sebagai katalisator. Pemberian TEMED dan APS harus disesuaikan dengan kebutuhan karena apabila terlalu banyak selain dapat menyebabkan teroksidasinya protein, juga dapat menyebabkan perubahan pada buffer, sedangkan bila pemakaian APS terlalu sedikit dapat memperlambat reaksi sehingga polimerasi akan berjalan lambat, selain itu pemilihan konsentrasi gel yang dapat menentukan keberhasilan pemisahan fraksi protein karena konsentrasi gel maka pori yang terbentuk semakin kecil. Pencucian dengan Elektro Buffer bertujuan untuk menghantarkan listrik agar cairan sampel dapat turun ke bawah. Pemberian asam asetat diperlukan untuk menghentikan reaksi agar pewarnaan tidak terlalu gelap sehingga dapat terbaca.

Metode SDS-PAGE dilakukan dengan menentukan perbedaan letak pita pada gel yang dibandingkan dengan marker protein. Untuk mendapatkan berat molekul (BM) yang tepat diperhitungkan dengan marker protein yang berkisar antara 28 – 250 kDa.

Preparasi sampel diambil dari oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi dengan metode SDS-PAGE. Penghitungan berat molekul dari pita-pita protein pada gel poliakrilamid dengan jalan membandingkan berat molekul (BM) dari marker, maka didapatkan hasil beberapa pita protein yaitu protein dengan berat molekul (BM) 146.46 kDa, 116.12 kDa, 101.02 kDa, 51.06 kDa, 39.94 kDa, 34.75 kDa, 31.67kDa, 15.07kDa.

Dari beberapa protein diatas, protein dengan BM 51.06 diidentifikasi sebagai protein GDF-9 yang berperan merangsang proliferasi sel granulosa dan menghambat diferensiasinya. Suplementasi GDF-9 dalam medium biakan akan meningkatkan pertumbuhan folikel preantral dan menstimulasi kandungan inhibin dan ovarium (Elvin *et al.*, 1999). Kerja biologis GDF-9 diperantarai oleh reseptor tipe I dan II bersama dengan kerja serine/threonine kinase yang diikuti dengan faktor phosphorylasi intrasel yang dinamakan Smads (Mazerbourgh *et al.*, 2003).

Hasil elektroforesis pada gambar terlihat kurang jelas dan masih didapatkan smear, hal ini terjadi karena protein yang dipakai jumlahnya masih terlalu banyak dan belum dilakukan pemurnian sehingga perlu dipecah lagi menjadi bagian yang terkecil.

Pada rangkaian penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji spesifikasi secara kualitatif dengan dot blot dan uji kuantitatif dengan western blot untuk

membuktikan bahwa berat molekul fraksi protein GDF-9 pada oosit yang diisolasi dari folikel dominan ovarium sapi adalah 51 kDa. Diharapkan protein yang bersifat imunogenik dapat dikembangkan lebih lanjut untuk pengembangan bahan antigen atau antibodi.

Protein dengan BM yang lebih besar kemungkinan bersifat lebih imunogenik dan dapat digunakan sebagai antigen, tetapi tidak menutup kemungkinan bahwa yang tipis dapat bersifat imunogenik. Salah satu faktor yang menentukan antigenitas suatu zat adalah besar molekul dan struktur molekul (Tizard, 1982). Sedangkan menurut Bellanti, 1993, zat yang imunogenik selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu imunogenik.

## **BAB 6**

# **KESIMPULAN DAN SARAN**

## **BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN**

### **6.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil fraksinasi protein GDF-9 yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi dengan metode SDS-PAGE didapatkan 8 fraksi protein yaitu : 146.46 kDa, 116.12 kDa, 101.02 kDa, 51.06 kDa, 39.94 kDa, 34.75 kDa, 31.67kDa, 15.07kDa. Berdasarkan hasil penghitungan persamaan regresi dari marker protein maka dapat diketahui BM protein GDF-9 adalah : 51.06.

### **6.2 Saran**

Saran yang disampaikan dari hasil penelitian adalah perlunya dilakukan pemurnian protein dan perlu penelitian lebih lanjut dengan imunoblotting untuk mengetahui protein yang imunogenik.

# RINGKASAN

## RINGKASAN

Perkembangan ovarium mamalia ditandai oleh perkembangan folikel primordial. Folikel primordial berkembang menjadi folikel primer, sekunder, dan selanjutnya menjadi folikel *de graff*. Selama proses folikulogenesis, perubahan ini diregulasi oleh hormon-hormon endokrin dan faktor parakrin. Selain hormon, selama proses folikulogenesis dan maturasi oosit juga dipengaruhi oleh faktor lokal yang ada di oosit, antara lain adalah *Growth Factor*. *Growth Factor* berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus, meski demikian, peran sesungguhnya dari faktor lokal oosit ini belum banyak dikaji secara mendalam. Proliferasi dan diferensiasi sel granulosa pada ovarium dipengaruhi oleh *Gonadotropin* sama banyak dengan parakrin yang disekresi oleh oosit dan sel somatik yang mengelilinginya. Faktor parakrin termasuk di dalamnya anggota dari superfamili TGF- $\beta$  yang juga merupakan *Growth Factor* derivat oosit yaitu GDF-9.

GDF-9 adalah suatu glikoprotein yang termasuk dalam Superfamili TGF- $\beta$  yang disekresi dari oosit dengan berat molekul 51kDa. GDF-9 merupakan faktor diferensiasi dan pertumbuhan sama seperti faktor tumbuh kembang lainnya yaitu TGF- $\beta$ , MIS, *Activin* dan *Inhibin*, juga termasuk BMP's. GDF-9 mempunyai fungsi meningkatkan kualitas oosit sebagai bank oosit yang digunakan untuk produksi embrio *in vitro*. Kerja biologis GDF-9 diperantarai oleh reseptor tipe I dan II bersama dengan kerja serine/threonine kinase yang diikuti dengan faktor phosphorylasi intrasel yang dinamakan Smads (Mazerbourgh *et al.*, 2003).

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi fraksi protein GDF-9 yang diisolasi dari oosit pada folikel dominan ovarium sapi yang dinyatakan dalam berat molekul dan diharapkan sebagai protein imunogenik yang dapat digunakan sebagai antibodi monoklonal untuk kepentingan dalam bidang transfer embrio.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *in vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Pelaksanaan penelitian ini berlangsung dari bulan Juli sampai bulan Oktober tahun 2007. Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH dicuci dengan menggunakan NaCl Fisiologis, kemudian dilakukan aspirasi pada folikel dominan dari ovariumnya, oosit diisolasi dari cairan folikelnya, dan diekstraksi dengan tehnik sonikasi. Identifikasi fraksi protein GDF-9 dilakukan dengan proses SDS-PAGE, yang kemudian hasilnya dinyatakan dalam satuan kDa.

Hasil penelitian didapatkan 8 fraksi protein yaitu : 146.46 kDa, 116.12 kDa, 101.02 kDa, 51.06 kDa, 39.94 kDa, 34.75 kDa, 31.67kDa, 15.07kDa yang berasal dari sel granulosa oosit sapi. Dari beberapa protein diatas, protein dengan BM 51.06 diidentifikasi sebagai protein GDF-9 yang berperan merangsang proliferasi sel granulosa dan menghambat diferensiasinya.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat ditarik kesimpulan bahwa dengan mengetahui berat molekul GDF-9 diharapkan adanya penelitian lebih lanjut dengan menggunakan immunoblotting untuk mengetahui protein yang imunogenik agar dapat dapat meningkatkan kualitas oosit yang dimaturasi secara

*in vitro* dan dapat memperbaiki potensi oosit untuk fertilisasi dan perkembangan embrional selanjutnya.

# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Aaltonen. J., M. P. Laitinen., K. Vuojolainen., R. Jaatinen., N. H. Kuitunen., L. Seppa., H. Louhio., T. Tuuri., J. Sjoberg., R. Butzow., O. Hovata., L. Dale., and O. Ritvos. 1999. Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Endo. Met.* 84 : 2744-2750.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan teknik analisis biomolekul. Edisi I. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal : 46-47.
- Bellanti. 1993. Immunologi III (Terjemahan). Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Bodensteiner, K. J., K. P. McNatty, C. M. Clay, C. L. Moeller, and H. R. Sawyer. 1999. Molecular cloning of the ovine growth differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol.Reprod.* 60 : 381-386.
- Boediono. A., T. Suzuki., L. Y. Li and R. A. Godke. 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and in vitro fertilized bovine embryos. *J. Mol. Reprod. Dev.* 53 : 159-170.
- Dellmann, H. D. dan E. M. Brown. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Penerbit Universitas Indonesia. UI Press. Jakarta. Hal : 486-500.
- Dyce, K. M., W. O. Sack, and C. J. G. Wensing. 1987. The Pelvic and Reproductive Organs of The Female Ruminants. Philadelphia : W. B. Saunders Company.
- Elvin, J. A., Y. Changning, P. Wang., K. Nishimori and M. M. Matzuki. 1999. Molecular Characterization of the follicle defects in the Growth differentiation factor-9 (GDF-9) deficient ovary. *J. Mol. Endo.* 13 : 1018-1034
- Elvin, J. A., Y. Changning and M. M. Matzuki. 2000. Growth differentiation factor-9 (GDF-9) stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *97(18)* : 10288
- Erickson, Gregory F. Normal ovarian function. *Clin Obstet Gynecol* 21:31, 1978.
- Glister, C. 2003. Oocyte Mediated Supression of follicle-Stimulating Gormone- and Insulin Like Growth Factor-Induced Secretion of Steroids and Inhibin-Related Protein by Bovine Granulosa Cells *In Vitro* : Possible Role of Transforming Growth Factor  $\alpha$ . *J. Biol. Reprod.* 68 : 758 – 765.

- Greve, T., Xu, K. P., Callesen, H., and P., Hytell. 1987. The Effects of Exogenous Gonadotropins on Oocyte and Embryo Quality in Cattle. *J. Of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 4 : 281-5.
- Hafez, E. S. E. 2000. *Reproduction in Farm Animal* 7<sup>th</sup> Edition. Lappincott Williams and Wilkin. Philadelphia.
- Hayashi. M., E. A. McGee., G. Min., C. Klein., U. M. Rose., M. Van Duin., A. J. Hsueh. 1999. Recombinant growth diferentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth differentiation of cultured early ovarian follicles. *J. Endo.* 140 : 1236-1244.
- Hytell, P., L. Faur, H. Callsen and L. Greve. 1997. Oocytes Growth, Capacitation and Final Maturation In Cattle. *J. Theriogenology.* 47 : 23-32.
- Ismudiono, 1999. *Fisiologi dan Reproduksi pada Ternak. Edisi II.* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jayawardhana, B. C., S. Takashi, N. Hiromi, K. Etsushi, T. Masafumi and M. Akio. 2006. Hormonal regulation of expression growth differentiation factor-9 (GDF-9) receptor type I and II genes in vitro the bovine ovarian follicle. *J. Repro.* 131(3) : 545.
- Kim, D. H., H. G. Korg, W. Han, H. K. Kim, D. S. Ko, H. J. Lee and K. S. Chung. 2000. Development Capacity of Mouse Oocyte Devided Form In Vitro and In Vivo Grown Preantral Follicle. *Inproceeding of the Annual Conference International Embrio Transfer Society Maastrict : The Netherland.*
- Margawati, E. T. 1994. The Effectivity of Growth Factor on In Vitro Embryo Development. *Media Veteriner* 6 (3) : 27-34.
- Mayes, M. 2002. *The Meiotic Arrest of Bovine Oocyte.* Thesis. Faculte Des Sciences De L'Agriculture et De L' Alimentation Universite Laval. Cuebec.
- Mazerbourg, S., C. Klein, A. J. Hsueh, N. Kaivo-Oja, O. Ritvos, D. G. Motterhead and O. Korchynski. 2003. growth differentiation factor (GDF-9) signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *J. Endo.* 2003-0393v1.
- McPherron. A. C., and S. J. Lee. 1993. GDF-3 and GDF-9 : two new members of the transforming growth factor-beta superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J.Biol. Chem.* 268 : 3444-3449.

- Meirio A. G., 2006. Identifikasi Dan Karakterisasi *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF  $\beta$ ) Sebagai Bahan Yang Berperan Pada Proses Pematangan Dan Differensiasi Oosit Sapi. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Patel, D., 1994. Gel Electrophoresis. John Willey and Sons. New York.
- Poernomo, B., Widjiati, M. Mafruchati, E. M. Luqman, E. D. Masithah, dan A. T. Mukti. 2004. Penuntun Embriologi. Pustaka Melati. Surabaya.
- Rantam, F.A., 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press, Surabaya.
- Scopes, R. K. 1987, Protein Purification, Principle and Practice. Edisi II. Springer Verlag. New York.
- Shimizu, T., M. Yokoo., Y, Miyake., H, Sasada., and E, Sato., 2004b. Differential expression of bone morphogenetic protein 4-6 (BMP-4, -5, -6) an growth differentiation factor-9 (GDF-9) during ovarian development in neonatal pigs. *Domestic animal endocrinology*. 27 : 397-405
- Tizzard, I. R. 1982. An introduction to Veterinary Immunology. 2<sup>nd</sup> Ed. W. B. Saunders Company. Ontario. Canada
- Toelihere, M. R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Angkasa. Bandung.
- Turner, C. D., dan J. T. Bagnara. 1988. Endokrinologi Umum. Edisi VI. Airlangga University Press. Surabaya. Hal : 566.
- Vitt U. A, McGee EA, Hayashi M & Hsueh AJ 2000a a *In vivo* treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141 : 3814-3820.
- Yatim, W., 1994. Reproduksi dan Embriologi. Tarsito. Bandung. Hal : 65-70.
- Widjiati. 2007. Induksi pematangan oosit secara *in vitro* oleh TGF- $\beta$  asal oosit kumulus kompleks. [Disertasi]. Universitas Brawijaya. Malang.
- www. Abcam. 2007

# LAMPIRAN

## Lampiran 1 : Penghitungan berat molekul (BM) pita protein

### 1.1 Penentuan Rf marker

Berat molekul (BM) protein dilakukan dengan mengitung nilai *Retardation factor* (RF) dari masing-masing pita (*band*) dengan rumus seperti di bawah.

$$Rf = \frac{\text{Jarak Pergerakan protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

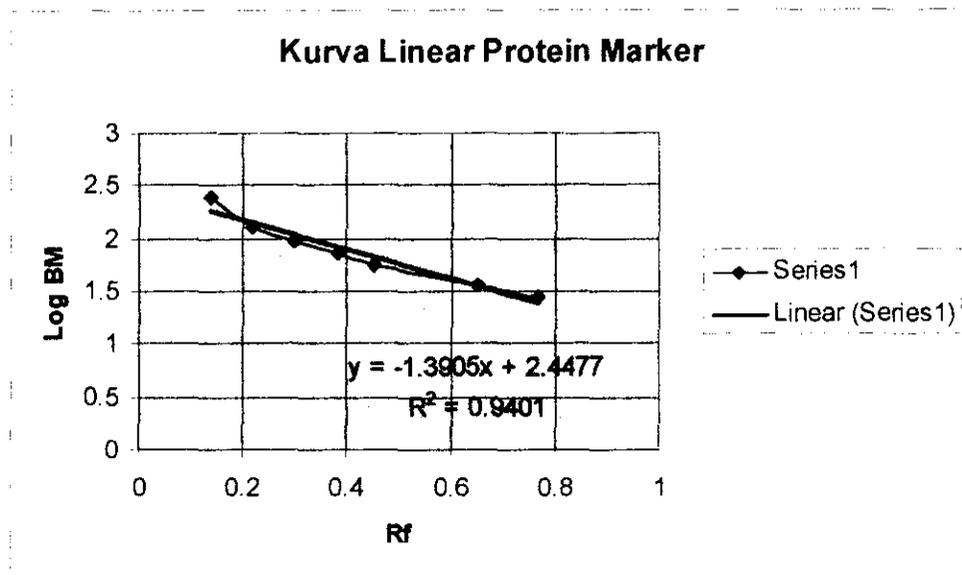
Penghitungan harga Rf dari protein standar (Marker) dengan satuan berat molekul (BM) kiloDalton (kDa) :

Jarak pergerakan warna dari tempat awal = 69 mm

Tabel 4. 1 Penghitungan Persamaan Regresi Protein Marker (BioRad)

Marker				
a	b	Rf	log BM	BM
9.5 mm	69 mm	$9.5/69 = 0.1376$	2.3979	250
15 mm	69 mm	$15/69 = 0.2173$	2.1139	130
20.5 mm	69 mm	$20.5/69 = 0.2971$	1.9777	95
26.5mm	69 mm	$26.5/69 = 0.384$	1.8573	72
31.5 mm	69 mm	$31.5/69 = 0.4515$	1.7403	55
45 mm	69 mm	$45/69 = 0.6521$	1.5563	36
53 mm	69 mm	$53/69 = 0.7681$	1.4471	28

## 1.2 Pembuatan Kurva standar



Gambar 4. 2. kurva Linear dari Protein Marker

Hasil analisa di atas dapat disimpulkan bahwa setiap perubahan x sebesar satu satuan maka y akan mengalami kenaikan satu satuan. Misalkan  $x = 1$  akan mempengaruhi perubahan y sebesar 1.0572 ( $2.4477 - 1.3905$ ). melalui  $R^2$  (Koefisien determinasi) untuk melihat apakah suatu model regresi yang dicocokkan sudah memadai dan dapat mengukur proporsi dari jumlah variasi y yang dapat diterangkan dengan model regresi.  $R^2$  bernilai 94.01% yang berarti bahwa 94.01% berasal dari variabel y dan 5.99% berasal dari variabel lain.

## 1.3 Penentuan Massa Molekul Relatif Protein

Massa molekul relatif ( $M_r$ ) protein dari masing-masing sampel ditentukan dengan mengkonversi data nilai Rf dan massa molekul relatif dari protein standar yang mempunyai persamaan :  $Y = 2.4477 - 1.3905 (X)$  dengan X adalah nilai Rf

sampel dan Y adalah nilai logaritma massa molekul relatif protein. Berat molekul

masing-masing sampel didapat dari anti-log nilai Y, maka :

Tabel 4.2 Perhitungan Berat Molekul Protein *Growth Differentiation Factor -9* (GDF-) pada oosit yang diisolasi dari Folikel Dominan ovarium sapi

Folikel Dominan				
A	B	Rf	Y	anti-log
14 mm	69 mm	$14/69 = 0.2028$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.2028) = 2.1657$	146.46
19 mm	69 mm	$19/69 = 0.2753$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.2753) = 2.0648$	116.12
22 mm	69 mm	$22/69 = 0.3188$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.3188) = 2.004$	101.02
36.7 mm	69 mm	$36.7/69 = 0.5318$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.5318) = 1.7081$	51.06
42 mm	69 mm	$42/69 = 0.6086$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.6086) = 1.6014$	39.94
45 mm	69 mm	$45/69 = 0.6521$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.6521) = 1.5409$	34.75
47 mm	69 mm	$47/69 = 0.6811$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.6811) = 1.5006$	31.67
63 mm	69 mm	$63/69 = 0.913$	$Y = 2.4477 - (1.3905 \times 0.913) = 1.1781$	15.07

**LAMPIRAN 3 : Bahan-bahan SDS PAGE****3.1 Membuat *Separating Gel 12%* untuk 2 plate**

Bahan :	LGB	2600 $\mu$ l
	T-Acryl	4000 $\mu$ l
	ddH <sub>2</sub> O	3400 $\mu$ l
	TEMED	50 $\mu$ l
	APS 10%	30 $\mu$ l

Diberikan terakhir karena membentuk gel dengan cepat

**3.2 Membuat *Stacking Gel 12%***

Bahan :	UGB	830 $\mu$ l
	T-Acryl	534 $\mu$ l
	SDS 0.5%	0.80 ml
	ddH <sub>2</sub> O	1950 $\mu$ l
	APS	40 $\mu$ l
	TEMED	4 $\mu$ l

**3.3 RSB (*Reducing Sample Buffer*)**

Bahan :	0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1 ml
	Gliserol 10 (v/v)	1.6 ml
	SDS 10% (v/v)	1.6 ml
	2mercaptoethanol	0.4 ml
	Bromophenol blue 0.1% (w/v)	0.2 ml
	ddH <sub>2</sub> O	8.0 ml

### 3.4 *Running Buffer*

Bahan :	Tris	3.03 gram
	Glycine	14.4 gram
	Methanol	200 ml
	ddH <sub>2</sub> O	1 L

### 3.5 *Larutan Staining (Pewarna GE) : Coumassie Brilliant Blue R-230 = 0.25 gram.*

Bahan :	Methanol Absolut	45.4 ml
	Asam asetat glacial	9.2 ml
	ddH <sub>2</sub> O	100 ml

### 3.6 *Larutan Destaining*

Bahan :	Methanol Absolut	7 ml
	Asam asetat glasial	7 ml
	ddH <sub>2</sub> O	100 ml

## LAMPIRAN 4 : Karakterisasi protein dengan SDS-PAGE

### 4.1 Mencetak *Separating Gel*

Langkah pertama adalah mencampurkan bahan-bahan penyusun *separating gel* sampai homogen (komposisi bahan seperti dijelaskan di lampiran 3). Kemudian dengan cepat dan larutan terus digoyang-goyang, masukkan campuran bahan tersebut ke dalam gelas *plate* yang telah bersekat dan lakukan fiksasi sedemikian rupa, sehingga hasil *separating gel* menjadi rata. Untuk meratakan bagian atas *separating gel*, tambahkan butanol di atasnya, kemudian inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar agar *separating gel* dengan *electrophoresis buffer* yang sudah diencerkan 10 kali, kemudian bersihkan dan keringkan *separating gel* dengan kertas filter.

### 4.2 Mencetak *Stacking Gel*

Campur bahan untuk membuat *stacking gel* (komposisi bahan seperti dijelaskan pada lampiran 3) sampai homogen, kemudian tuang ke dalam cetakan yang telah tercetak dengan *separating gel*, kemudian masukkan *comb* dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar sampai *stacking gel* padat. Setelah *stacking gel* padat, lepas *comb* kemudian bersihkan dan cuci *stacking gel*.

### 4.3 Persiapan sampel

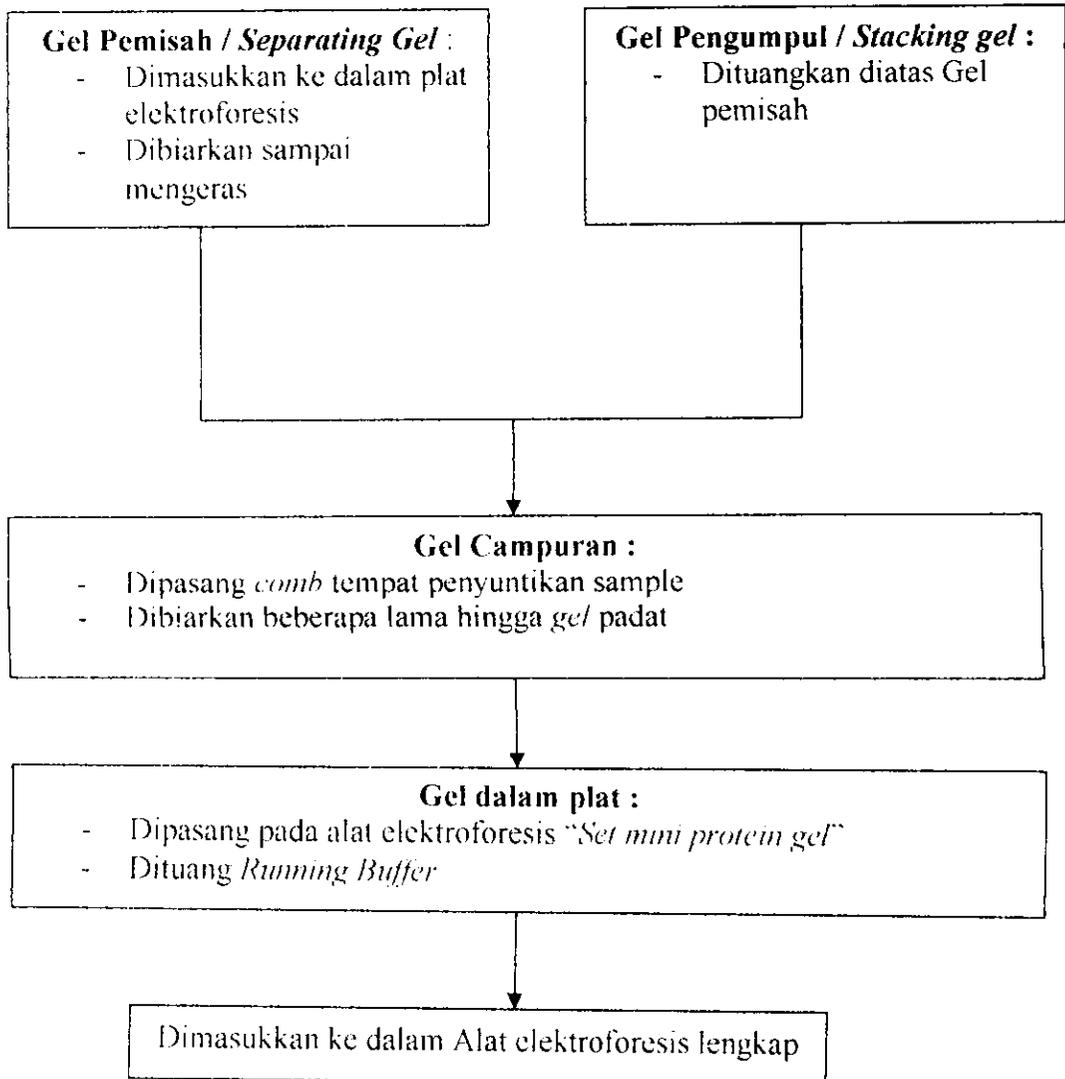
Sampel dicampur ke dalam *RSB* yang berfungsi untuk mempercepat proses kenaikan protein dengan perbandingan 40 $\mu$ L sample ditambah 20 $\mu$ L *RSB* dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf kemudian dilakukan denaturasi protein dengan memanaskan campuran tersebut pada suhu 100°C selama 5 menit.

#### 4.4 Elektroforesis

Pasang gelas *plate* yang berisi *separating gel* dan *stacking gel* ke dalam elektroforesis (sebelum sekat dilepas) dan fiksasi *plate* dengan baik. Selanjutnya masukkan sampel ke dalam cetakan *stacking gel* melalui sekat-sekat *comb* sebanyak 10 $\mu$ l. Kemudian nyalakan elektroforesis dengan voltase 125V dan dengan kuat arus sebesar 40 mA, yang perlu diperhatikan adalah jangan sampai timbul gelembung udara pada saat kita memasukkan sampel. Untuk menghentikan proses elektroforesis harus menunggu sampai semua sampel turun melewati *stacking gel*.

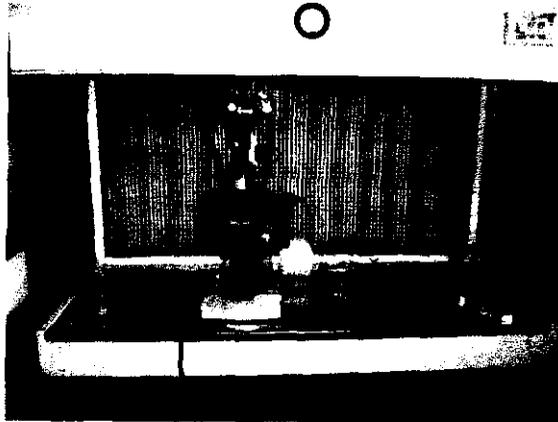
#### 4.5 Tahap Pencucian dan Pewarnaan

Tahap pencucian dan pewarnaan yang dilakukan dengan menggunakan larutan *staining* untuk pewarnaan dan *destaining* untuk pencucian sambil digoyangkan dengan penggoyang otomatis sampai gel menjadi jernih (Dengan komposisi di lampiran 3). Kemudian hasil elektroforesis difoto atau di scan

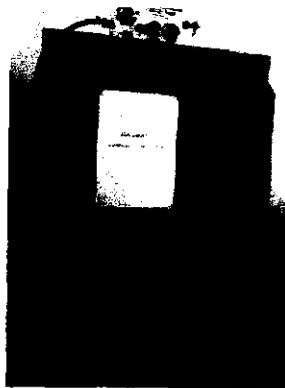
**Diagram Alir Persiapan Gel**

**Lampiran 5 : Alat dan Bahan fertilisasi *in vitro***

**5.1 Alat-alat Fertiliasi *in vitro***



Laminar flow dan mikroskop *inverted* merk Meiji



Inkubator Cell House merk Heto

**5.2 Bahan-bahan Fertilisasi *in vitro***



Cairan folikuler hasil aspirasi folikel

**5.3 Aspirasi folikel**

