

SKRIPSI

**UJI SPESIFISITAS *GROWTH DIFFERENTIATION*
FACTOR-9 (GDF-9) YANG DIKOLEKSI DARI
OOSIT SAPI DENGAN METODE
*WESTERN BLOTTING***



Oleh :

MEGA INDAH SURYANI
060513461

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**UJI SPESIFISITAS *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9* (GDF9)
YANG DIKOLEKSI DARI OOSIT SAPI DENGAN
METODE *WESTERN BLOTTING***

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

Oleh

MEGA INDAH SURYANI
060513461

Menyetujui

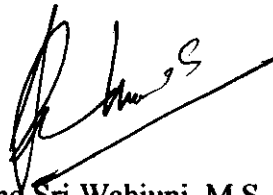
Komisi Pembimbing,

Pembimbing Pertama



(Prof. Dr. Imam Mustofa, drh., M.Kes)
NIP. 131 653 421

Pembimbing Kedua



(Retno Sri Wahjuni, M.S., Drh)
NIP. 131 470 992

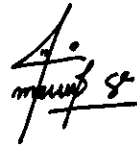
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**UJI SPESIFISITAS *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9* (GDF-9)
YANG DIKOLEKSI DARI OOSIT SAPI DENGAN
METODE *WESTERN BLOTTING***

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, Juni 2009



MEGA INDAH SURYANI
NIM. 060513461

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 6 Mei 2009

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua	: Prof. Dr. Wurlina, M.S., drh
Sekretaris	: Dr. Widjiati, M.Si., drh
Anggota	: Hermin Ratnani, M.Kes., drh
Pembimbing I	: Prof. Dr. Imam Mustofa, M.Kes., drh
Pembimbing II	: Retno Sri Wahjuni, M.S., drh

Telah diuji pada

Tanggal : 20 Mei 2009

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Dr. Wurlina, M.S., drh

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

Hermin Ratnani, M.Kes., drh

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

Retno Sri Wahjuni, M.S., drh

Surabaya, Juni 2009

Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh
NIP. 130 687 305

**SPECIFICITY TEST OF *GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9*
(GDF-9) WHICH COLLECTED FROM COW OOCYTE WITH
WESTERN BLOTTING METHOD**

MEGA INDAH SURYANI

ABSTRACT

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) is a growth factor with 51 kDa relative molecular mass in cow. GDF-9 is member of *Transforming Growth Factor Beta (TGFβ)* superfamily which is expressed in oocyte and synthesized at follicular growth. The objective of this research was to determine the specificity of GDF-9 protein which collected from cow oocyte, with anti GDF-9 monoclonal antibody (AP2069a) by using *Western Blotting* method. This research was done at *In Vitro* Fertilization Laboratory of Faculty Veterinary Medicine Airlangga University Surabaya and at Laboratory of Biochemistry of Mathematic and Science Faculty Brawijaya University, at September - December of 2008. The result showed that there was positive reaction of *Western Blotting* at 51 kDa protein band with anti GDF-9 monoclonal antibody (AP2069a). It could concluded that protein band with 51 kDa relative molecular mass of cow oocyte was protein specific of GDF-9.

Key Words : *Growth Differentiation Factor-9, Western Blotting, Cow Oocyte.*

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul **Uji Spesifisitas *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) Yang Dikoleksi Dari Oosit Sapi Dengan Metode *Western Blotting*.**

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada :

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya Prof. Hj. Romziah Sidik, PhD., drh atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Prof. Dr. Imam Mustofa, M.Kes., drh selaku dosen pembimbing pertama dan Retno Sri Wahjuni, M.S., drh selaku dosen pembimbing kedua atas saran dan bimbingannya sampai dengan terselesainya skripsi ini.

Prof. Dr. Wurlina, M.S., drh. selaku ketua penguji skripsi, Dr. Widjiati, M.Si., drh. selaku sekretaris penguji skripsi sekaligus dosen pembimbing penelitian, dan Hermin Ratnani, M.Kes., drh selaku anggota penguji skripsi atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Seluruh Staf pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya atas wawasan keilmuan selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Ayahku Surjadi dan Mamaku Astutik Sulaiman yang telah memberikan nasihat dan pengertiannya, motivasi, semangat serta do'a dan bimbingan dalam diri ananda baik material maupun spiritual dalam penyusunan skripsi ini.

Kakakku Lina Rachmawati yang selalu membantu, menghibur, dan mensupport penulis saat skripsi ini disusun. Adik-adikku Novy Anggraeni Puspitasari dan Ahmad Arief Fatchur Rozy yang selalu menghibur dan mensupport penulis saat skripsi ini disusun.

Sahabat-sahabat tercintaku Mahaka, Endah, Deya, Dama, Novy, Intan yang telah memberikan semangat dan motivasi hingga terselesainya skripsi ini. Eliza, Feni, Nunung, dan Yosi, yang merupakan teman sepenelitian terima kasih atas dukungan kalian selama penelitian ini. Teman-teman FKH'05 terima kasih atas bantuan, semangat, dan motivasi dalam penelitian ini. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu tetapi sudah membantu dalam penyusunan skripsi ini terima kasih atas bantuan kalian.

Penulis menyadari bahwa makalah ini jauh dari sempurna, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca sebagai upaya penyempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca umumnya serta dapat memberikan sumbangan yang positif di bidang pendidikan Kedokteran Hewan dan dapat dijadikan sumber penelitian selanjutnya.

Surabaya, Juni 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	i
HALAMAN PERNYATAAN.....	ii
HALAMAN IDENTITAS.....	iii
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 Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 5
2.1 Transfer Embrio.....	5
2.2 Fertilisasi <i>In vitro</i>	6
2.3 Oogenesis dan Follikulogenesis.....	7
2.4 <i>Growth Differentiation Factor-9</i>	9
2.5 <i>Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel</i> <i>Elektrophoresis</i>	11
2.6 <i>Western Blotting</i>	13
 BAB 3 MATERI DAN METODE.....	 15
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	15
3.2 Materi Penelitian.....	15
3.2.1 Koleksi Oosit.....	15
3.2.2 Isolasi Protein.....	16
3.3 Metode Penelitian.....	16
3.3.1 Koleksi Oosit.....	16
3.3.2 Isolasi Protein.....	17
3.3.3 SDS PAGE.....	17
3.3.4 <i>Western Blotting</i>	18
3.3.5 Kerangka Operasional Penelitian.....	19
 BAB 4 HASIL PENELITIAN.....	 20
 BAB 5 PEMBAHASAN.....	 22

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....25
 6.1 Kesimpulan..... 25
 6.2 Saran..... 25

RINGKASAN.....26

DAFTAR PUSTAKA..... 28

LAMPIRAN.....32

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.5.1	Hasil analisis protein dengan metode SDS PAGE.....	12
4.1	Hasil analisis protein dengan metode <i>Western Blotting</i>	20

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Alat dan Bahan Penelitian.....	32
2. Diagram koleksi oosit.....	34
3 Diagram <i>Western Blotting</i>	35
4 Larutan Bahan Penelitian.....	36
5 Katalog GDF-9 Antibodi (N-term).....	37

DAFTAR SINGKATAN

BCIP	= <i>Bromo Chloro Indolyl Phosphate</i>
BMP15	= <i>Bone Morphogenetic Protein 15</i>
BSA	= <i>Bovine Serum Albumin</i>
cAMP	= <i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
DNA	= <i>Deoxyribo Nucleid Acid</i>
EGF	= <i>Epidermal Growth Factor</i>
FSH	= <i>Folikel Stimulating Hormon</i>
GDF9	= <i>Growth Differentiation Factor 9</i>
IEF	= <i>Iso Electric Focusing</i>
IFN	= <i>Interferon</i>
IGF	= <i>Insulin Like Growth Factor</i>
IGFBP	= <i>Insulin Like Growth Factor Binding Protein</i>
kDA	= <i>Kilo Dalton</i>
LH	= <i>Luteinizing Hormon</i>
MAb	= <i>Monoklonal Antibodi</i>
NaCl	= <i>Natrium Chlorida</i>
OWS	= <i>Oosit Washing Solution</i>
PAF	= <i>Platelete Activating Factor</i>
PBS	= <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBST	= <i>Phosphate Buffer Saline Transfer</i>
PDGF	= <i>Platelete Derived Growth Factor</i>

PMSF	= <i>Phenyl Metil Sulfonyl Fluoride</i>
RPH	= Rumah Potong Hewan
SDS PAGE	= <i>Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis</i>
TE	= Transfer Embrio
TGF α	= <i>Transforming Growth Factor Alfa</i>
TGF β	= <i>Transforming Growth Factor Beta</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sapi merupakan salah satu ternak yang cukup potensial untuk dikembangkan. Ada dua hal yang harus diperhatikan dalam perkembangbiakannya, yaitu peningkatan produktivitas dan mutu genetik. Sehubungan dengan permasalahan tersebut, kemajuan penelitian di bidang bioteknologi reproduksi diharapkan dapat menunjang produktivitas ternak sapi. Dalam rangka meningkatkan produktivitas ternak sapi, berbagai teknik telah dikembangkan. Salah satu teknik yang telah dikembangkan adalah transfer embrio (TE). Namun kemajuan di bidang transfer embrio belum mampu memenuhi kebutuhan embrio dengan kuantitas maupun kualitas yang baik. Angka kebuntingan hasil transfer embrio dengan menggunakan embrio yang diproduksi melalui fertilisasi *in vitro* masih rendah. Rendahnya angka kebuntingan hasil TE asal fertilisasi *in vitro* tersebut perlu dikaji secara reproduksi molekular (Olevia, 2005).

Fertilisasi *in vitro* terdiri dari proses maturasi *in vitro*, inseminasi *in vitro*, dan kultur embrio *in vitro*. Pada proses maturasi banyak protein diduga berperan dalam proses pematangan oosit termasuk *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)*, *inhibin*, *activin*, *Fibroblast Growth Factor*, *Interferon (IFN)*, *Platelete Activating Factor (PAF)*, *Platelete Derived*

Growth Factor (PDGF), dan *Relaxin Like Factor*. Sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekular belum banyak diketahui (Hafez *et al.*, 2000).

Growth factor (faktor pertumbuhan) adalah *hormone like polypeptide* dan protein, yang bekerja secara parakrin dan autokrin yang merangsang aktivitas mitogenik pada jaringan yang mengalami proliferasi (Hafez *et al.*, 1980). *Growth Factor* berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus (Widjiati dkk., 2008).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) merupakan suatu *growth factor* dengan masa molekul relatif 51 kDa pada sapi. Senyawa GDF-9 merupakan anggota dari superfamily *Transforming Growth Factor Beta (TGFB)* yang diekspresikan dalam oosit dan disintesis sepanjang pertumbuhan folikel. Senyawa GDF-9 dinyatakan berada dalam ovarium khususnya pada oosit yang mempunyai peranan-peranan dalam follikulogenesis yaitu untuk perkembangan folikel, perkembangan sel granulosa, dan sel teka, serta untuk maturasi oosit, karena GDF-9 sudah ada sejak proses follikulogenesis.

Protein GDF-9 pada sapi dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kualitas oosit lewat sinyal transduksi oleh ligan TGFB. Protein yang telah diidentifikasi melalui metode SDS PAGE belum tentu mengandung protein yang diinginkan, namun dapat mengandung protein lain yang memiliki masa molekul relatif yang sama atau mendekati. Perlu uji spesifisitas untuk

memastikan bahwa pita protein hasil SDS PAGE mengandung protein yang dikehendaki. Salah satu metode uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah dengan uji *Western Blotting* (Hayati, 2008). Metode ini sangat efektif digunakan untuk mendapatkan protein yang spesifik (Rantam, 2003). Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk uji spesifisitas GDF-9 yang dikoleksi dari oosit sapi yang dilakukan dengan metode *Western Blotting*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

“Apakah protein dengan masa molekul relatif 51 kDa hasil SDS PAGE oosit sapi yang dikoleksi dari folikel dominan ovarium sapi dengan metode *Western Blotting* yang menggunakan monoklonal antibodi anti GDF-9 adalah protein spesifik GDF-9 ? ”.

1.3 Landasan Teori

GDF-9 merupakan superfamily dari TGF β , yang khusus diekspresikan pada oosit mamalia (Elvin *et al.*, 1999 ; Pangas *et al.*, 2004). Karakter protein GDF-9 pada folikel dominan ovarium sapi sangat mempengaruhi proses maturasi oosit karena protein GDF-9 mempengaruhi perubahan *Cumulus* dan peningkatan produksi androgen pada sel teka juga produksi inhibin pada sel granulosa (Widjiati dkk., 2008).

Western Blotting dapat digunakan untuk menguji spesifisitas suatu protein terhadap MAb anti GDF-9 (Rantam, 2003). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa SDS PAGE oosit sapi menghasilkan pita protein dengan masa molekul relatif 51 kDa yang diidentifikasi sebagai GDF-9 (Hayati, 2008). Apabila pita protein tersebut bereaksi positif terhadap *Western Blotting* menggunakan MAb anti GDF-9, maka dapat diketahui spesifisitas protein tersebut sebagai GDF-9.

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan spesifisitas GDF-9 yang dikoleksi dari oosit sapi dengan metode *Western blotting* yang menggunakan MAb anti GDF-9.

1.5 Manfaat Penelitian

Diketahuinya spesifisitas protein GDF-9 yang dikoleksi dari oosit sapi diharapkan dapat bermanfaat dalam memperkaya khasanah pengetahuan biologi reproduksi molekular yang nantinya dapat dijadikan dasar bagi penelitian selanjutnya dan memperoleh dasar pengetahuan dan data karakteristik tentang protein GDF-9 selama proses maturasi oosit sapi secara *in vitro*, sehingga dapat meningkatkan kualitas oosit dan memperbaiki potensi oosit untuk fertilisasi *in vitro* dan perkembangan embrional selanjutnya.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Transfer Embrio

Transfer embrio pertama kali berhasil dilakukan oleh Heape pada tahun 1890 dengan kelinci sebagai hewan percobaannya (Seidel dan Hafez, 1980 ; Gordon, 2005). Asal embrio untuk TE bisa dari *in vivo* maupun *in vitro*. Fertilisasi *in vitro* terdiri dari proses maturasi oosit *in vitro*, inseminasi *in vitro*, dan kultur embrio *in vitro*. Pada maturasi oosit sangat diperlukan peran GDF-9 untuk meningkatkan kualitas oosit yang digunakan untuk TE.

Di bidang peternakan, transfer embrio merupakan salah satu alternatif pengembangan bidang bioteknologi reproduksi untuk meningkatkan produktivitas ternak. Dengan transfer embrio diharapkan terjadi peningkatan angka kebuntingan pada resipien sehingga dapat meningkatkan jumlah populasi ternak, dengan demikian dapat mengurangi ketergantungan impor ternak. Keberhasilan transfer embrio dibutuhkan perangkat penunjang yang memadai seperti jumlah embrio yang mencukupi dengan umur yang seragam dan mempunyai viabilitas (daya hidup) yang tinggi. Namun saat ini viabilitas (daya hidup) embrio yang dihasilkan secara *in vitro* masih cukup rendah (Widjiati, 2006).

Metode yang digunakan dalam transfer embrio adalah metode pembedahan dan tanpa pembedahan. Metode pembedahan ini menunjukkan sekitar 50% hewan resipien menjadi bunting setelah transfer embrio. Transfer dua embrio dengan masing-masing satu embrio ke dalam tiap

tanduk uterus dapat digunakan untuk mengimbas kembar dua. Sedangkan kerugiannya, transfer dua embrio ke dalam satu tanduk uterus seringkali mengakibatkan kematian. Sedangkan keuntungan metode tanpa pembedahan ini yaitu menekan biaya pelaksanaan transfer embrio, dan agar lebih mudah dimanfaatkan oleh peternak komersial. Kerugiannya yaitu memakan banyak waktu, memerlukan keterampilan tinggi, dan hasilnya belum memuaskan (Hunter, 1995).

2.2 Fertilisasi *In Vitro*

Teknologi fertilisasi *in vitro* terdiri dari beberapa tahap, yaitu maturasi oosit, inseminasi *in vitro* dan kultur embrio *in vitro*. Maturasi oosit merupakan satu tahap penting dalam rangkaian fertilisasi *in vitro*. Keberhasilan maturasi oosit *in vitro* sangat menentukan keberhasilan fertilisasi *in vitro*, karena hanya oosit yang matang yang akan berhasil dibuahi oleh sel spermatozoa (Mahaputra dan Mustofa, 2000).

Pengumpulan oosit sapi dapat dilakukan dengan aspirasi folikel berpenampang 1-5 mm pada ovarium dengan menggunakan jarum 18G yang dihubungkan dengan alat suntik yang berisi cairan pencuci oosit (*Oosit Washing Solution*, OWS). Oosit yang didapat masih memerlukan proses pematangan untuk mencapai stadium metafase II (memiliki *pronucleus* dan *polar body I*). Pertumbuhan *in vitro* tersebut membutuhkan media dengan berbagai suplementasi (Hafez and Hafez, 2000), agar kondisi lingkungannya sesuai dengan kondisi fisiologis yang terjadi secara *in vivo*. Oosit yang telah

matang yaitu pada tingkat metafase II, sama dengan oosit yang baru mengalami ovulasi sehingga siap melebur dengan sel spermatozoa. Suplementasi bahan bioaktif tertentu dapat dilakukan untuk meningkatkan hasil proses pematangan oosit, sehingga perkembangan embrio lebih baik setelah oosit matang tersebut diinseminasi *in vitro* (Mahaputra dkk., 1998 ; Mustofa dkk., 1999 ; Restiadi, 2001).

2.3 Oogenesis dan Follikulogenesis

Oogenesis dibagi menjadi 3 tahap yaitu tahap proliferasi, pertumbuhan, dan pematangan. Tahap proliferasi terjadi pada saat prenatal sampai beberapa saat pasca lahir. Pada tahap ini pembelahan terjadi secara mitosis. *Primordial Germ Cell* yang dihasilkan berjumlah 40.000-300.000 buah. Tahap pertumbuhan terjadi setelah hormon pertumbuhan mulai dilepas dalam peredaran darah. Primordial folikel akan berkembang menjadi folikel primer. Folikel primer berkembang menjadi folikel sekunder dan terjadi penambahan sel granulosa. Folikel sekunder berkembang menjadi folikel tersier yang ditandai dengan perkembangan antrum (folikel antral). Folikel tersier akan berkembang menjadi folikel de Graaf yang dikelilingi oleh sel granulosa dan sel theca interna dan eksterna. Folikel de Graaf berkembang terus yang diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum. Pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormon estrogen yang dihasilkan oleh sel theca yang akan merangsang pelepasan hormon *Luteinizing Hormon (LH)*. Sekresi hormon LH ini akan menggerakkan terjadinya ovulasi (Widjiati, 2006).

Tahapan pertama perkembangan folikel terjadi pertumbuhan pada waktu hewan betina masih berada dalam kandungan dan setelah lahir. Cadangan folikel primordial dibentuk selama masa kehidupan fetus atau segera setelah lahir, beberapa folikel primordial tumbuh secara konstan selama kehidupan sampai cadangan habis (Hafez and Hafez, 2000; Ismudiono dkk., 2007).

Pertumbuhan pada tahap kedua meliputi pertumbuhan folikel primer menjadi folikel sekunder pada waktu hewan betina telah lahir dan menjalani proses pendewasaan tubuh. Tidak semua folikel primer berkembang menjadi sekunder tetapi hanya sebagian saja, menurut perkiraan kurang dari sepertiga jumlah dari folikel primer. Pada tahap ketiga terjadi perkembangan folikel sekunder menjadi folikel tersier yang ditandai dengan lebih banyaknya sel granulosa. Pertumbuhan sel granulosa yang terdapat pada permukaan folikel lebih cepat, sehingga di bagian dalam terjadi ruangan yang disebut antrum folliculi yang berisi cairan folikel yang disebut sebagai liquor folliculi yang kaya akan protein dan estrogen. Perkembangan folikel sekunder menjadi folikel tersier ini terjadi pada waktu hewan menjadi dewasa dan dilanjutkan pada waktu hewan mengalami siklus birahi (Ismudiono dkk., 2007).

Pertumbuhan folikel tersier menjadi folikel de Graaf oleh beberapa peneliti dikatakan hanya terjadi proses pemasakan saja, sebab folikel tersier hanya berbeda dalam besarnya dan terjadi hanya beberapa hari menjelang estrus (Ismudiono dkk., 2007). Terbentuknya folikel de Graaf menunjukkan

bahwa sel telur yang ada di dalamnya telah siap untuk diovulasikan (Poernomo dkk., 2004).

2.4 *Growth Differentiation Factor 9 (GDF9)*

Protein GDF-9 merupakan superfamily dari *Transforming Growth Factor Beta* (TGFB). Protein GDF-9 pertama kali ditemukan pada awal tahun 1990. Protein GDF-9 ditemukan pada oosit didalam ovarium. Peran protein GDF-9 ini tergantung dari fungsi ovarium. Pada tikus betina, hilangnya protein GDF-9 menyebabkan *infertil* yang disebabkan karena gagalnya pembentukan folikel pada ovarium. (Oja *et al.*, 2008).

Protein GDF-9 berperan dalam proses pematangan sel telur yang merupakan ligan spesifik reseptor TGFB. Sekresi protein GDF-9 akan memacu sekresi TGFB sehingga akan menghalangi transfer cAMP dari granulosa ke oosit, akibatnya cAMP dalam oosit turun dan proses maturasi dapat berjalan. Kekurangan protein GDF-9 akan mengganggu proses pematangan telur (Mustakim, 2008).

Oosit memproduksi protein dari jenis family *Transforming Growth Factor Beta* (TGFB) yaitu protein GDF-9 dan *Bone Morphogenetic Protein 15* (BMP15). Kedua protein ini berperan dalam perkembangan folikel pada rodensia, domba dan manusia. Sebagai tambahan bahwa kedua protein ini juga berfungsi untuk mengatur ovulasi pada domba, walaupun telah ada bukti bahwa protein GDF-9 dan BMP15 sama-sama berhubungan dengan

perkembangan folikel dan ovulasi, namun peran kedua protein ini berbeda pada masing-masing spesies (McNatty *et al.*, 2005).

Peran dari protein GDF-9 ada pada saat sepanjang perkembangan folikel. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tikus yang kekurangan protein GDF-9 menjadi infertil karena adanya suatu hambatan pada saat perkembangan folikel primer yang mengakibatkan kesalahan pada proliferasi dan diferensiasi sel granulosa. Protein GDF-9 ini 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 (Widjiati dkk., 2008).

Protein GDF-9 pada oosit merupakan derivat *growth factor* untuk pertumbuhan folikel. Protein GDF-9 menstimulasi folikel primordial dan pertumbuhan folikel primer di dalam sel granulosa. Protein GDF-9 melekat didalam oosit tergantung dari jenis spesiesnya. Hilangnya protein GDF-9 menyebabkan infertil pada tikus betina, penyebabnya adalah gagalnya proses follikulogenesis (Montgomery *et al.*, 2004).

Protein GDF-9 diekspresikan dalam oosit dan mempunyai peran dalam proses follikulogenesis. Fungsi protein GDF-9 sebagai kontrol pada proses ovulasi. Protein GDF-9 yang teridentifikasi sebagai *Growth Factor* ini sangat berpengaruh terhadap fungsi sel ovarium. Protein GDF-9 yang merupakan superfamily dari TGF β mampu mengatur perkembangan folikel ovarium (Zhang *et al.*, 2008).

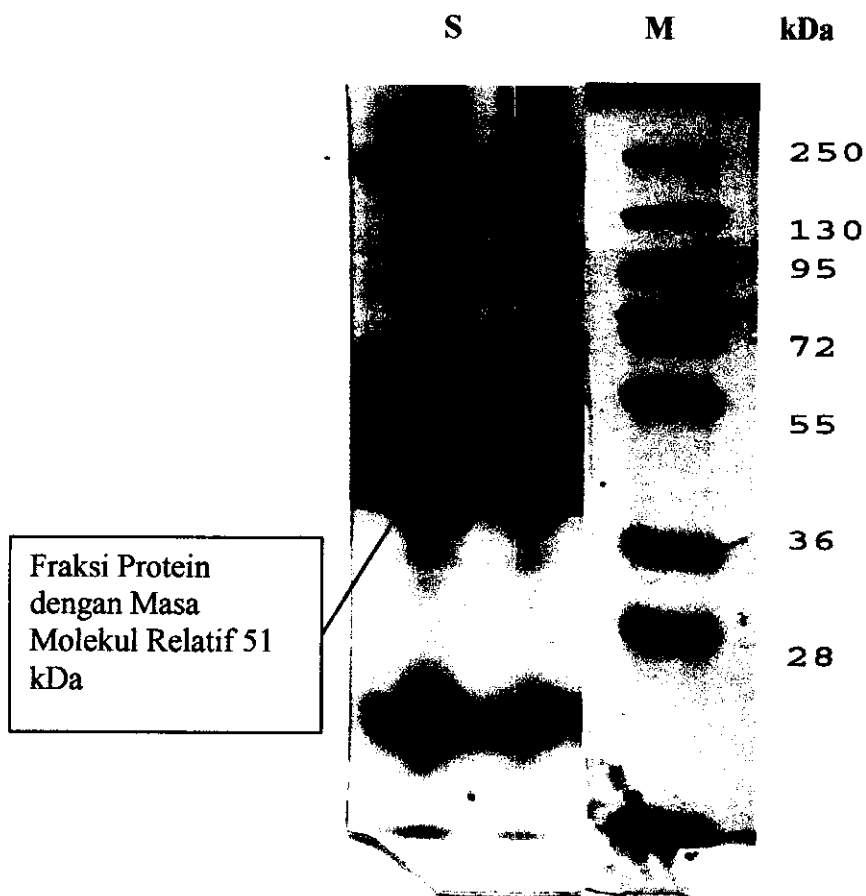
Protein GDF-9 merupakan superfamily dari TGF β , berfungsi sebagai pengatur perkembangan folikel dalam ovarium. Pada penelitian ini, protein GDF-9 mampu mengatur perkembangan folikel melalui sistem kultur ovarium secara *in vitro*. Mekanisme ini juga membuktikan bahwa protein GDF-9 ini juga mampu mempengaruhi perkembangan sel teka, sel granulosa, dan korpus luteum (Nilson dan Skinner, 2002).

2.5 SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Elektrophoresis)

Elektroforesis adalah suatu metode yang digunakan untuk karakterisasi protein antigen berdasarkan masa molekul relatifnya dan untuk mengetahui titik elektrik dengan IEF (*Iso Electric Focusing*). Metode elektroforesis terdiri dari satu dimensi elektroforesis (SDS PAGE) dan dua dimensi elektroforesis (IEF-SDS-PAGE) (Rantam, 2003).

Prinsip kerja pada SDS PAGE adalah protein dielektroforesis dalam detergen ionik, yaitu *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrophobik peptida, sehingga dapat membuka rantai peptida secara lengkap. Dengan demikian protein SDS-komplek bermigrasi melalui poliakrilamid tergantung dari berat molekulnya (Rantam, 2003).

SDS PAGE berguna bagi purifikasi protein yang selanjutnya dapat digunakan untuk imunisasi. Protein yang diperlakukan dengan SDS menghasilkan antibodi yang sangat kuat dengan mempertahankan afinitas yang tinggi terhadap protein natif (Smith, 1995).



Gambar 2.5.1 : Hasil analisis protein dengan metode SDS PAGE (Hayati, 2008).

Keterangan :

S : Sampel yang berasal dari oosit sapi.

M : Marker.

Ada dua sistem pada SDS yaitu kontinyu (*Weber and Osbon*) dan diskontinyu (*Laemmli*). Pada sistem kontinyu campuran protein dilapiskan pada bagian atas (*band* pada bagian atas dari *separating gel*), sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Sedangkan pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion pada *stacking gel* dan *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis berupa pita atau *band* yang tipis (Rantam, 2003).

2.6 *Western Blotting*

Blotting merupakan teknik pemindahan makromolekul, dari medium gel ke atas membran setelah proses elektroforesis. Pita-pita yang terpisah dapat dideteksi dengan pewarnaan baik untuk protein, karbohidrat, maupun untuk aktifitas enzim. *Immunoblotting* merupakan aplikasi yang spesifik dari teknik *blotting* protein dengan memanfaatkan interaksi antigen dengan antibodi sebagai cara deteksi protein spesifik yang telah dipindahkan ke atas kertas membran setelah *elektroforesis* (Mack and Sally, 1995).

Pemisahan protein dengan SDS PAGE digunakan sebagai isolat anti GDF-9 dan selanjutnya ditransfer ke membran nitroselulosa yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *Fast-Red* atau *commasie blue*. *Western Blotting* digunakan reaksi antigen dengan antibodi spesifiknya yang selanjutnya divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *Fast Red* atau *commasie blue* dan digunakan untuk membedakan reaksi silang diantara protein dan digunakan studi untuk modifikasi protein selama protein disintesis di dalam sel. Keuntungan metode ini adalah membran nitroselulosa setelah direaksikan dengan substrat, pencucian dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan. Selain itu metode ini mudah dilakukan pengecatan protein, *autoadiography*, *colorimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay* (Rantam, 2003). Ikatan yang terjadi antara protein antigenik dengan antibodi divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *fast red* / *western blue* sehingga dapat diketahui

informasi masa molekul relatif dan jumlah protein yang spesifik (Andriani, 2005).

Metode ini sangat efektif digunakan untuk mendeteksi antigen yang mempunyai ukuran kecil dalam larutan yang banyak mengandung protein. Antibodi yang digunakan harus mempunyai spesifikasi tinggi dan mempunyai daya ikat yang stabil (10^8 - 10^{10} M^{-1}). Antibodi monoklonal sangat spesifik terhadap antigen, tetapi mempunyai daya afinitas rendah. Sebelum digunakan dilakukan klon agar didapatkan titer yang tinggi (Rantam, 2003). Penggunaan antibodi monoklonal memerlukan tingkat keahlian yang tinggi dan kerja berat untuk produksinya (Smith, 1995), namun sifat monoklonalitasnya menghasilkan spesifisitas yang tinggi (Zola, 1995).

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB 3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan di Laboratorium Biokimia Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini berlangsung selama 4 bulan yang dimulai pada bulan September 2008 - Desember 2008.

3.2 Materi Penelitian

3.2.1 Koleksi Oosit

Bahan yang digunakan untuk koleksi oosit adalah Ovarium sapi yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH). Media yang diperlukan antara lain; *Phosphate buffer saline* (Gibco), *Bovine Serum Albumin* (BSA), *Gentamycin Sulfat*, Alkohol 70%, NaCl fisiologi, kertas tissue steril, dan Aquades. Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam koleksi oosit adalah Jangka sorong untuk mengukur diameter permukaan folikel, mikroskop inverted (Meiji), selang infuse, petridish disposable, petridish gelas, erlenmeyer, disposable syringe, gunting (Tajimaco S.S), pinset (Tajimaco S.S), gelas ukur, pembakar bunsen, gelas objek, gelas penutup, spuit, jarum 18G, cawan petri, tabung Eppendrof, dan Beaker glass (Widjiati, 2006). Alat dan bahan penelitian dapat dilihat pada lampiran 1.

3.2.2 Isolasi Protein

Bahan yang digunakan pada isolasi protein adalah *Phosphate buffer saline (PBS)* dan ditambahkan aquades hingga satu liter, *Phosphate buffer saline (PBS) - Tween* yang terdiri dari *PBS* 100 ml dan *Tween* 50 ml, *Phosphate buffer saline (PBS) - Tween* 100 ml yang ditambah 400 ml *PMSF (Phenyl Metil Sulfonil Fluoride)*, etanol dingin dan buffer *Tris HCl*. Alat yang digunakan pada isolasi protein adalah : Mikropipet, sonikator, refrigerator, sentrifuse (Medifuge), label, cawan Petri dan tabung Eppendrof. (Widjiati, 2006).

3.3 Metode Penelitian

3.3.1 Koleksi Oosit

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) dan disimpan dalam NaCl fisiologi yang telah diberi tambahan Gentamycin sulfat 50 µg/ml. Ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan dicuci dengan NaCl fisiologi yang diberi Gentamycin sulfat sampai beberapa kali pencucian hingga darah yang menempel pada ovarium benar-benar sudah bersih atau cairan pencuci menjadi jernih. Folikel pada permukaan ovarium yang berdiameter 5-10 mm diambil secara aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18G yang dihubungkan dengan spuit 5 ml yang berisi 1 ml PBS yang telah diberi tambahan BSA 0,3% dan Gentamycin sulfat 50 µg/ml. Aspirasi folikel berdasarkan diameter permukaan folikel, yaitu folikel yang berukuran 5-10 mm. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak 3 kali

di dalam medium *Phosphate Buffer Saline* (PBS), kemudian di masukkan ke dalam tabung Eppendorf dan diberi label yang selanjutnya disimpan di dalam freezer (lihat lampiran 2) (Widjiati, 2006).

3.3.2 Isolasi Protein

Sampel oosit hasil koleksi dilarutkan didalam larutan *PBS* yang telah ditambah 0.05 mM *PMSF* (*Phenyl Metil Sulfonyl Fluoride*). Sampel dicuci dengan *PBS*, dengan cara memindahkan sampel ke dalam cawan petri yang sudah berisi *PBS*. Selanjutnya sampel dipindah ke dalam larutan *PBS*. Oosit dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang sudah berisi *PBS* yang mengandung *Tween* 100 ml dan divortek, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm 4°C selama 30 menit. Supernatan ditampung sebagai fraksi protein oosit, lalu ditambah 20 mM *Tris-Cl* 200 µl kemudian disimpan dalam freezer suhu -10°C selanjutnya siap digunakan sebagai isolat (Widjiati, 2006).

3.3.3 SDS PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*)

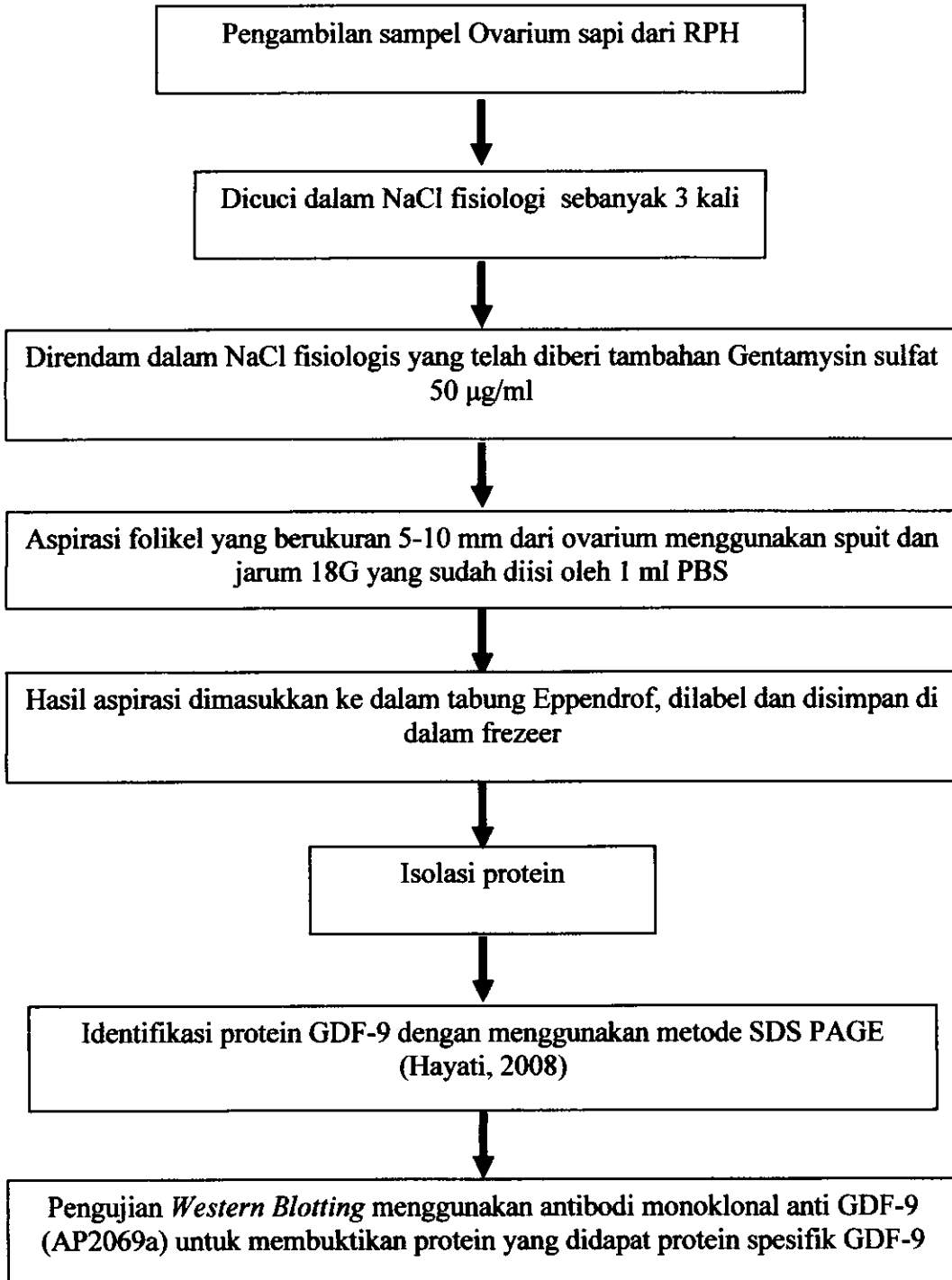
Setelah oosit dikoleksi didapatkan beberapa macam ukuran folikel (5-10 mm), kemudian dilakukan isolasi protein yang digunakan untuk isolat. Selanjutnya hasil dari isolasi protein, dilakukan dengan metode SDS PAGE. Hasil identifikasi masa molekul relatif dari isolat GDF-9 tersebut adalah 51 kDa. Protein yang telah teridentifikasi melalui metode SDS PAGE belum tentu mengandung protein yang diinginkan namun dapat mengandung protein lain yang memiliki masa molekul relatif yang sama atau mendekati. Perlu uji spesifisitas untuk memastikan bahwa pita protein hasil SDS PAGE

mengandung protein yang dikehendaki. Salah satu metode uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah dengan uji *Western Blotting*.

3.3.4 *Western Blotting*

Prosedur *Western Blotting* dilaksanakan mengikuti diagram sebagaimana pada lampiran 3. Pertama-tama gel yang mengandung fragmen protein yang terpisah berdasarkan masa molekul relatifnya dicuci dengan aquades lalu direndam dalam Buffer Transblot. Membran Nitrosellulosa dicuci dalam PBS dan direndam dalam Buffer Transblot. Spon dan kertas Whatmann direndam dalam Buffer Transblot. Selanjutnya disusun satu gel yaitu Black side (atas), spon, kertas Whatmann 6 lembar, gel, membran nitrosellulosa, kertas whatmann 9 lembar, spon, dan red side (bawah). Transfer pada 25V selama 12 jam pada suhu 4⁰C. Diblocking dalam blocking buffer (PBS / Skim milk 5%) selama 1 jam, digoyang, lalu dicuci 3 x 5 menit dalam PBST. Diinkubasi dengan antibodi monoklonal (1:100 dalam PBS / Skim) selama semalam pada suhu 4⁰C, kemudian dicuci 3 x 5 menit dalam PBST. Diinkubasi dengan antibodi monoklonal (1:2500 dalam PBST) selama 1 jam suhu ruang, lalu dicuci 4 x 5 menit dalam PBST. Diinkubasi dengan *Western Blue* substrat solution (dalam ruang gelap) sampai terlihat warna band, lalu dicuci dengan aquades. Berbagai macam larutan yang dipakai sebagai bahan penelitian dapat dilihat pada lampiran 4.

3.3.5 Kerangka Operasional Penelitian

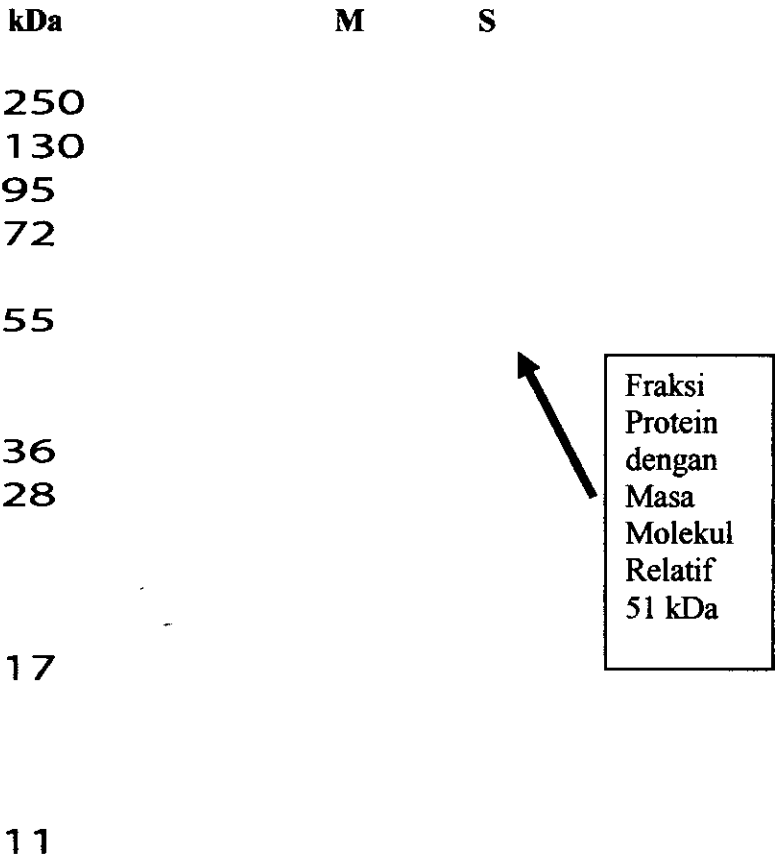


BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB 4 HASIL PENELITIAN

Penelitian untuk mengetahui spesifisitas protein *Growth Differentiation Factor-9*, dilakukan analisis dengan metode *Western Blotting* menggunakan Monoklonal antibodi anti GDF-9 sehingga didapatkan hasil pada gambar 4.1. Hasil *Western Blotting* ditampilkan dengan pewarnaan *Bromo Chloro Indolyl Phosphate* (BCIP).



Gambar 4.1: Hasil analisis protein dengan metode *Western Blotting*.

Keterangan :
S : Sampel yang berasal dari oosit sapi.
M : Marker.

Pada penelitian sebelumnya hasil SDS PAGE, hasil fraksi protein yang teridentifikasi sebagai protein GDF-9 mempunyai masa molekul relatif sebesar 51 kDa (Hayati, 2008). Berdasarkan gambar tersebut diperoleh pita protein yang terspesifikasi dengan metode *Western Blotting* menggunakan monoklonal antibodi anti GDF-9 mempunyai masa molekul relatif sebesar 51 kDa.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB 5 PEMBAHASAN

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) merupakan suatu *growth factor* dengan masa molekul relatif 51 kDa pada sapi. Senyawa GDF-9 merupakan anggota dari superfamily *Transforming Growth Factor Beta* (TGFB) yang diekspresikan dalam oosit dan disintesis sepanjang pertumbuhan folikel. Protein GDF-9 berperan merangsang proliferasi dan differensiasi sel granulosa.

Protein yang telah diidentifikasi melalui metode SDS PAGE belum tentu mengandung protein yang diinginkan, namun dapat mengandung protein lain yang memiliki masa molekul relatif yang sama atau mendekati. Perlu uji spesifisitas untuk memastikan bahwa pita protein hasil SDS PAGE mengandung protein yang dikehendaki. Salah satu metode uji spesifisitas yang biasa digunakan adalah dengan uji *Western Blotting*.

Western Blotting adalah suatu *immunoblotting* yang digunakan untuk aplikasi yang spesifik dengan memanfaatkan interaksi antigen dengan antibodi sebagai cara deteksi protein yang telah dipindahkan ke atas kertas membran nitroselulosa setelah *elektroforesis*. Keuntungan dari metode ini adalah membran nitroselulosa setelah direaksikan dengan substrat, pencucian, dan pereaksian dengan monoklonal antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan (Rantam, 2003). Metode *Western Blotting* antara lain telah dipergunakan untuk menguji spesifisitas protein ND (Adi dkk., 2005), mendiagnosa penyakit bakteri pada ginjal berdasarkan deteksi dari antigen p57

terhadap *Renibacterium salmoninarum* (McIntosh and Austin, 1999), mendiagnosis terhadap saliva yang telah diinfeksi dengan *Helicobacter pylori* (Ballam *et al.*, 2000).

Hasil pemisahan protein dengan SDS PAGE dinyatakan dengan masa molekul relatif. Protein yang telah teridentifikasi dengan SDS PAGE ini diuji spesifisitas dengan menggunakan *Western Blotting* yang prinsipnya adalah interaksi antigen dengan antibodi spesifiknya yang selanjutnya divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan (Rantam, 2003).

Pada *Western Blotting* gel hasil elektroforesis mula-mula bereaksi dengan antibodi primer yaitu antibodi spesifiknya, pada penelitian ini menggunakan MAb anti GDF-9. Antibodi primer akan mengikat antigen (protein yang diidentifikasi GDF-9) yang telah dipindahkan ke atas membran nitroselulosa. Apabila antibodi primer dapat berikatan dengan antigen, maka terbentuklah sebuah pita / band. Membran nitosellulosa dicuci untuk menghilangkan antibodi primer yang tidak terikat antigen, sehingga hanya pita / band spesifik yang terdeteksi. Membran nitrosellulosa kemudian direaksikan dengan antibodi sekunder. Antibodi sekunder dikonjugasikan dengan *alkaline phosphate* sebagai substratnya untuk mengikat pewarnaannya. Pada penelitian ini substrat *alkaline phosphate* menggunakan *Bromo Chloro Indolyl Phosphate* (BCIP) sebagai pewarnaannya. *Bromo Chloro Indolyl Phosphate* akan memberikan warna biru hitam keunguan pada pita yang spesifik (Davis *et al.*, 1994).

Uji spesifisitas pada penelitian ini menggunakan isolat GDF-9 sebagai antigen yang sudah diidentifikasi melalui metode SDS PAGE yang akan direaksikan dengan MAb anti GDF-9. Hasil SDS PAGE pada penelitian yang sebelumnya dapat diketahui bahwa GDF-9 yang teridentifikasi memiliki masa molekul relatif sebesar 51 kDa (Hayati, 2008). Hasil *Western Blotting* diketahui molekul GDF-9 berikatan spesifik dengan MAb anti GDF-9. Monoklonal antibodi anti GDF-9 dapat mendeteksi GDF-9 sebagai suatu pita dengan masa molekul relatif 51 kDa, dengan demikian dapat diyakini bahwa pita yang muncul saat elektroforesis dengan SDS PAGE adalah pita GDF-9 dengan masa molekul relatif 51 kDa.

Berdasarkan gambaran hasil analisis dengan uji spesifisitas metode *Western Blotting* oosit sapi yang menggunakan MAb anti GDF-9 tersebut diketahui bahwa protein *Growth Differentiation Factor-9* telah dibuktikan spesifisitasnya. Protein yang telah spesifik GDF-9 ini sebaiknya dilakukan isolasi dengan elektroelusi untuk modifikasi media kultur sehingga dapat meningkatkan hasil maturasi *In vitro* dan akan memperjelas peran dari GDF-9.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa protein dengan masa molekul relatif 51 kDa hasil *Western Blotting* oosit sapi, menggunakan monoklonal antibodi anti GDF-9 adalah protein spesifik GDF-9.

6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah :

Protein spesifik GDF-9 yang mempunyai masa molekul relatif 51 kDa, sebaiknya pada penelitian lebih lanjut dilakukan isolasi dengan elektroelusi untuk modifikasi media kultur sehingga dapat meningkatkan hasil maturasi *In vitro* dan akan memperjelas peran dari GDF-9.

RINGKASAN

MEGA INDAH SURYANI. Uji Spesifisitas *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) Yang Dikoleksi Dari Oosit Sapi Dengan Metode *Western Blotting*. Dibimbing oleh Prof. Dr. Imam Mustofa, M.Kes., drh. sebagai dosen pembimbing pertama dan Retno Sri Wahjuni, M.S., drh. sebagai dosen pembimbing kedua.

Perkembangan ovarium mamalia ditandai dengan perkembangan folikel primordial. Folikel primordial berkembang menjadi folikel primer. Folikel primer akan berkembang menjadi folikel sekunder. Folikel sekunder akan berkembang menjadi folikel tersier, yang selanjutnya akan berkembang menjadi folikel *de Graaf*. Pada proses follikulogenesis, perubahan ini dipengaruhi oleh hormon endokrin, faktor parakrin, dan *Growth Factor*. *Growth Factor* berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi kumulus (Widjiati dkk., 2008). GDF-9 merupakan superfamily dari TGF- β yang juga merupakan anggota dari *Growth Factor*.

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) merupakan suatu *growth factor* dengan masa molekul relatif 51 kDa pada sapi. Senyawa GDF-9 merupakan anggota dari superfamily *Transforming Growth Factor Beta* (TGF β) yang diekspresikan dalam oosit dan disintesis sepanjang pertumbuhan folikel. Senyawa GDF-9 dinyatakan berada dalam ovarium khususnya pada oosit yang mempunyai peranan-peranan dalam

follikulogenesis yaitu untuk perkembangan folikel, perkembangan sel granulosa, dan sel teka, serta untuk maturasi oosit.

Pada penelitian ini bertujuan untuk membuktikan spesifisitas GDF-9 yang dikoleksi dari oosit sapi dengan metode *Western blotting* yang menggunakan Monoklonal antibodi anti GDF-9.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Fertilisasi *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya dan di Laboratorium Biokimia Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dimulai bulan September 2008 sampai bulan Desember 2008. Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH dicuci dengan menggunakan NaCl fisiologis, kemudian dilakukan aspirasi pada folikel yang berdiameter 5-10 mm ovarium sapi. Uji spesifisitas protein GDF-9 dilakukan dengan metode *Western Blotting*, yang kemudian hasilnya terlihat pada gambar 4.1.

Berdasarkan dari penelitian yang telah dilakukan dan telah ditarik kesimpulan, bahwa hasil fraksi protein GDF-9 yang terspesifikasi dengan metode *Western Blotting* mempunyai masa molekul relatif sebesar 51 kDa. Protein spesifik GDF-9 yang mempunyai masa molekul relatif 51 kDa, sebaiknya pada penelitian lebih lanjut dilakukan isolasi dengan elektroelusi untuk modifikasi media kultur sehingga dapat meningkatkan hasil maturasi *In vitro* dan akan memperjelas peran dari GDF-9.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Adi, M. A. A. A., I. B. O. Winaya, I Made K., I W Suardana, I N Suarsana, Iwan, H. U., N M Asatawa, IGM Krisna, E., IA Pasti, A., Hayashi, dan Yasunobu, M. 2005. Deteksi Antibodi Newcastle Disease pada Itik Bali Menggunakan Metode *Western Blotting*. *J. Vet.* 6 (1) : 1-6.
- Andriani. 2005. Karakterisasi Protein Larva Kedua (L2) Jaringan Cacing *Toxocara Cati* dengan Menggunakan Metode *Western Blot*. Skripsi FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ballam, L. D., M. A. Mendall, M. Asante, J. Morris, D. P. Strachan, P. H. Whincup, and D. G .Cook. 2000. Western blotting is useful in the salivary diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *J. of Clin. Pathology.* 53 (4) : 314-317.
- Davis, L., M. Kuehl, J. Battey. 1994. *Basic Methods In Molecular Biology.* United States Of America.
- Elvin, A. Julia., Changning, Y., Pei, W., Katsuhiko, N., and Martin, M. M. 1999. Molecular Characterization of the Follicle Defects in the *Growth Differentiation Factor-9* Deficient Ovary. *T. J. of Molecular Endocrinology* : 13 (6) : 1018-1034.
- Gordon, I. 2005. *Reproductive Technologies in Farm Animals.* CABI Publishing. London.
- Hafez E. S. E., M. R. Jainudeen, and Y. Rosnina. 2000. *Homones, Growth Factors, and Reproduction.* in Hafez, E. S. E., and B. Hafez (Ed). *Reproduction in Farm Animals.* Lea and Febiger. USA.
- Hafez E. S. E, M. C. Levasseur, and C. Thibault. *Folliculogenesis*, 1980. *Egg Maturation, and Ovulasi.* In Hafez, E. S. E (Ed). *Reproduction in Farm Animals.* Lea and Febiger. Philadelphia. USA.
- Hafez E. S. E and B. Hafez. 2000. *Fertilization and Cleavage.* In : Hafez E. S. E (Ed). *Reproduction in farm animals.* 7th Ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.

- Hayati, Z. N. 2008. Identifikasi dan Karakterisasi Protein *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) yang iisolasi dari Oosit pada Folikel Dominan Ovarium Sapi. Skripsi FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hunter, F. H. R. 1995. Fisiologi dan Tekhnologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. ITB Bandung dan Universitas Udayana.Bandung.
- Ismudiono, H. Anwar, P. Srianto, S. P. Madyawati, A. Samik, dan E. Safitri. 2007. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mack, and Sally. 1995. *Imuno-Blotting*. In - Burgess. W. Graham (Ed). Tekhnologi Elisa Dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Indonesia.
- Mahaputra L, Hinting A, Mustofa I, dan Utama S. 1998. Aplikasi Transfer Embrio Beku Hasil Fertilisasi *in vitro* untuk Membuat Kebuntingan Kembar Fraternal pada Resipien Sapi Friesian Holstein. JPUA 6(2) : 43-48.
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2000. Pemanfaatan teknologi bayi tabung untuk mengembangkan bank embrio sapi Madura. Media Kedokteran Hewan. 16 (3) : 17-20.
- McIntosh, D., and B. Austin. 1999. The validity of *Western blotting* for the diagnosis of bacterial kidney disease based on the detection of the p57 antigen of *Renibacterium salmoninarum*. J. of Microbiol. Methods. 25 (3) : 329-335.
- McNatty, P. K., J. L. Juengel, K. L. Reuder, S. Lun, S. Myllyma, S. B. Lawrence, A. Western, M. F. Meerasahib, D. G. Mottershead, N. P. Groome, O. Ritvos, and M. P. F. Laitinen. 2005. *Bone Morphogenetic Factor 15* and *Growth Differentiation Factor 9* Co-operate to Regulate Granulosa Cell Function in Ruminant. T. J. Societe for Reproduction and Fertility. 129 (4) : 481-487.
- Montgomery, W. G., Z. Z. Zhao, Marsh, R. Mayne, S. A. Trellor, M. James, N. G. Martin, D. I. Boomsma, and D. L. Duffy. 2004. A Deletion Mutation in GDF9 in Sisters with Spontaneous DZ Twins. Genetic Epidemiology Laboratory. Queensland Institute of Medical Research Brisbane. Australia. J. Biological Psychologi. Free University Amsterdam. The Netherland ; 7 (6) : 548-555.

- Mustakim, Z. 2008. Identifikasi *Growth Differentiation Factor 9* (GDF9) pada Oosit Sapi yang Dimaturasi secara *In vitro* dengan Metode Elektroforesis. Skripsi FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mustofa I, Mahaputra L dan Utama S, 1999. Identifikasi kinerja serum sapi FH dan kuda birahi dalam media maturasi oosit terhadap perkembangan sigot sapi Madura. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga*. 7 (2) : 42-51.
- Nilson, E. E., and M. K. Skinner. 2002. *Growth and Differentiation Factor 9* Stimulates Progression of Early Primary but Not Primordial Rat Ovarian Follicle Development. *T. J. Biology of Reproduction. School of Molecularr Biosciences. Pullman. Washington*. 67 (3) : 1018-1024.
- Oja, K. N., J. Bondestam, M. Kamarainen, J. Koskimies, U. Vitt, M. Crafield, K. Vuojolainen, J. P. Kallio, V. M. Olkkonen, M. Hayashi, A. Moustakas, N. P. Groom, P. T. Dijke, A. J. W. Hsueh, And O. Ritvos. 2008. *Growth Differentiation Factor 9* Induces Smad2 Activation and Inhibin B Production in Cultured Human Granulosa Luteal Cells. *T. J. Clin. Endocrinol. Metab*. 88 (2) : 755-762.
- Olevia, E. 2005. Identifikasi *Transforming Growth Factor Beta* (TGFB) Pada Oosit Sapi yang Telah Dimaturasi. Skripsi FKH. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Pangas, A. S., Carolina, J. J., and Martin, M. M. 2004. *Growth Differentiation Factor 9* Regulates Expression of the Bone Morphogenetic Protein Antagonist Gremlin. *J. Biol. Chem* 279 (31) : 32281-32286.
- Poernomo, B., M. Mafruchati, Widjiati, E. M. Luqman, E. D. Masithah, dan A. T. Mukti. 2004. *Penuntun Embriologi*. Pustaka Melati. Surabaya.
- Rantam, A. Fedik. 2003. *Metode imunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Restiadi TI. 2001. Pengaruh Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) pada Maturasi dan fertilisasi *in vitro* Oosit Kambing Lokal. *Media Kedokteran Hewan* 16 (1) : 25-30.
- Seidel, E. G. S. T., E. S. E. Hafez. 1980. Embrio Transfer. In : E. S. E. Hafez (Ed). *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia.

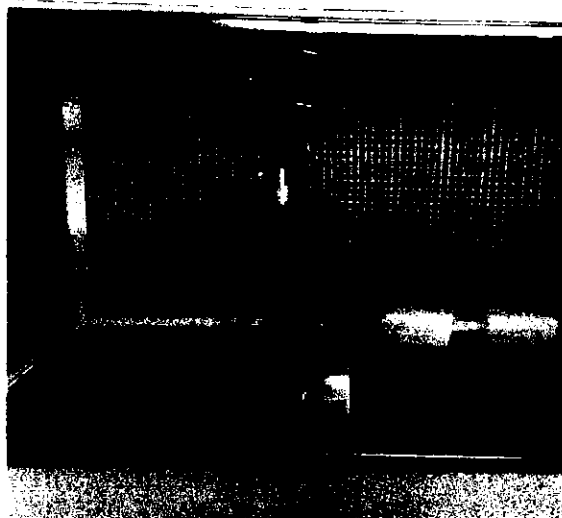
- Smith, R. J. 1995. Produksi Serum Hiperimun. In : Burgess, W. Graham (Ed). Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Indonesia.
- Widjiati. 2006. Induksi Maturasi Oocytes Secara *In vitro* oleh *Transforming Growth Factor β* Asal Oosit Kumulus Komplek. Disertasi Minat Ilmu Ternak. Universitas Brawijaya. Malang.
- Widjiati, N. Z. Hayati, Ismudiono, dan Sukmanadi. 2008. Identifikasi Protein *Growth Factor-9* (GDF9) yang Diisolasi dari Oosit pada Folikel Dominan Ovarium Sapi. TPJUA. Veterinaria Medika. Surabaya. 1 (2) : 39-42.
- Zhang, Y., H. Du, J. Chen, G. Yang, X. Zhang. 2008. Porcine *Growth Differentiation Factor 9* Gene Polymorphisms and their Associations with Litter Size. J. Genet. Genomics 35 (3) : 163-169.
- Zola, H. 1995. Produksi Antibodi Monoklonal. In : Burgess. W. Graham (Ed). Teknologi Elisa Dalam Diagnosis dan Penelitian. Gadjah Mada University Press. Indonesia.

LAMPIRAN

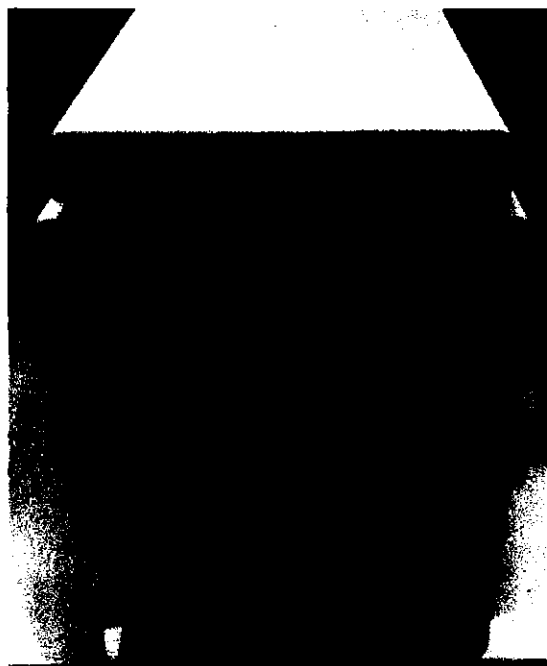
LAMPIRAN

Lampiran 1 : Alat dan Bahan Penelitian

1.1 Alat Penelitian



Mikroskop *inverted* merk meiji

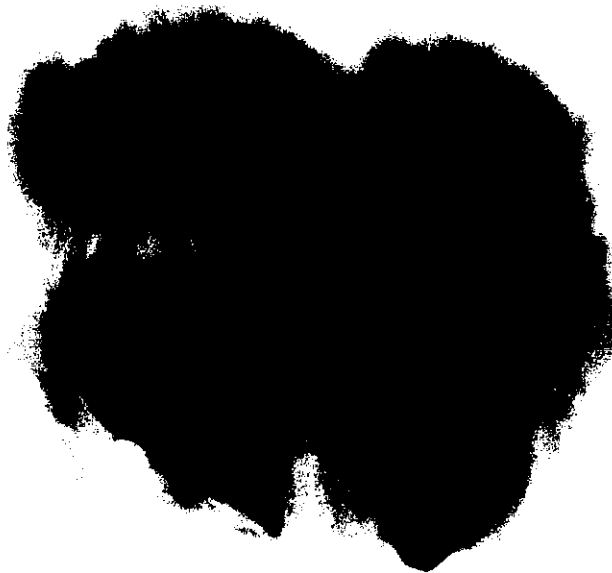


Sentrifuse

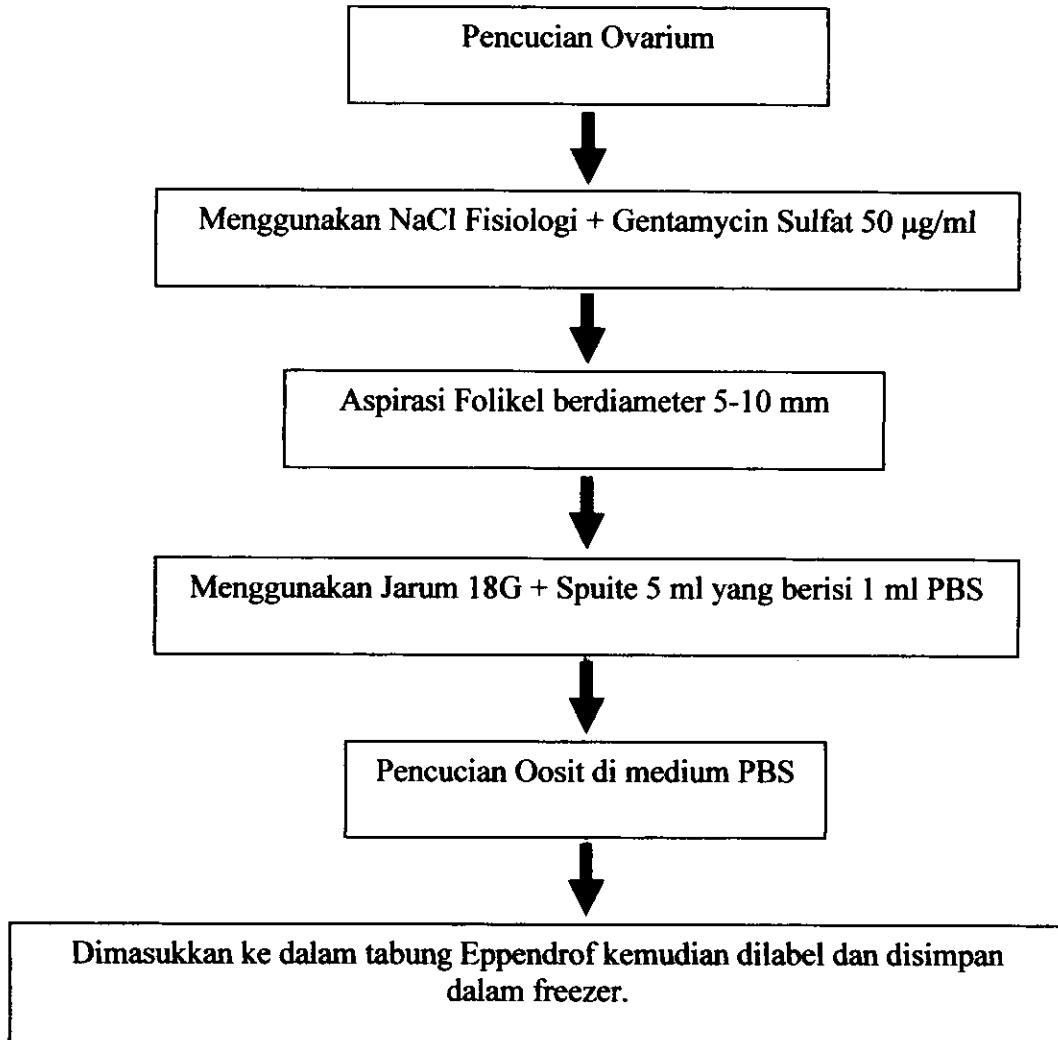


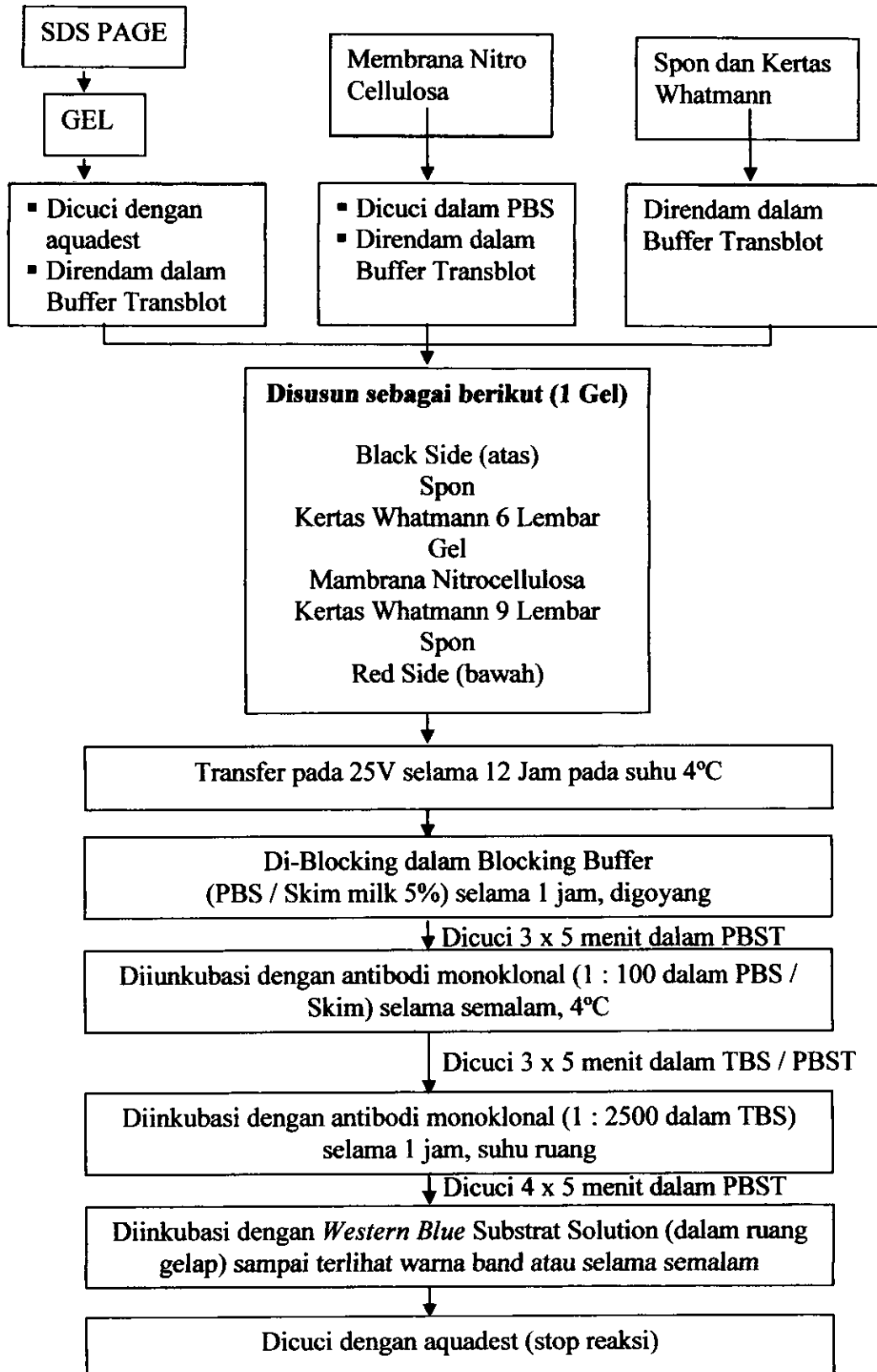
Alat Sterilisasi

1.2 Bahan Penelitian



Ovarium sapi

Lampiran 2. Diagram Koleksi Oosit

Lampiran 3. Diagram *Western Blotting*

Lampiran 4 : Larutan Bahan Penelitian**4.1 Larutan Buffer Transfer (pH 8.4)**

- Tris Base : 3.03 gram
- Glisin : 14.4 gram
- Methanol : 200 ml
- H₂O : 1 Liter

4.2 Larutan Phosphate Buffer Salin

- PBS : 100 ml
- Antibiotik (Gentamycin Sulfate) : 1.0 µl/ml
- BSA : 0.03 gr
(dimasukkan terakhir dan tidak boleh diaduk atau digoyang)

4.3 Larutan Tris Buffer Salin

- NaCl : 8.7 gram
- Tris : 1.21 gram
- ddH₂O : 1 Liter
- HCl Pekat sampai pH 7.4

Lampiran 5 : Katalog GDF-9 Antibodi (N-term)

Technical data sheet - AP2069a

Page 1 of 1



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. Vitt, 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:

