

SKRIPSI

**UJI SPESIFITAS PROTEIN GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) PADA
OOSIT SAPI YANG DIKOLEKSI DARI FOLIKEL ANTRAL DENGAN
METODE DOT BLOT**



Oleh :

MUHAMMAD TEGUH SETIAWAN
NIM 060413375

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**UJI SPESIFITAS PROTEIN GDF-9 (*Growth Differentiation factor-9*) PADA
OOSIT SAPI YANG DIKOLEKSI DARI FOLIKEL ANTRAL
DENGAN METODE DOT BLOT**

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

oleh

MUHAMMAD TEGUH SETIAWAN
NIM 060413375

Menyetujui
Komisi pembimbing



(Dr. Widjiati, M.Si., Drh)

Pembimbing Pertama

NIP 131877882



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

Pembimbing Kedua

NIP 132087866

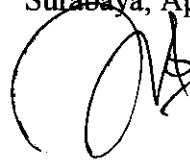
PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi berjudul :

**UJI SPESIFITAS PROTEIN GDF-9 (*Growth Differentiation factor-9*) PADA
OOSIT SAPI YANG DIKOLEKSI DARI FOLIKEL ANTRAL
DENGAN METODE DOT BLOT**

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, April 2009



Muhammad Teguh Setiawan
NIM 060413375

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian

Tanggal : 24 Maret 2009

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D,M.Phill.,drh
Sekretaris : Dr.Rr.Sri Pantja Madyawati,M.Si.,drh
Anggota : Gracia Angelina H,M.Si.,drh
Pembimbing I : Dr.Widjiati,Msi.,drh
Pembimbing II : Moh.Sukmanadi,M.Kes.,drh

Telah diuji pada

Tanggal : 13 April 2009

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D,M.Phill.,drh

Anggota : Dr.Rr.Sri Pantja Madyawati,M.Si.,drh

Gracia Angelina H,M.Si.,drh

Dr. Widjiati,M.Si.,drh

Moh.Sukmanadi,M.Kes.,drh

Surabaya, 20 April 2009



Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,

Prof. Hj. Romziah Sidik, Ph.D., drh
NIP. 130 687 305

**SPECIFIC TEST OF GROWTH DIFFERENTIATION FACTOR-9 (GDF-9)
ON BOVINE OOCYTE COLLECTED FROM ANTRAL FOLLICLE
USED DOT BLOT METHOD**

Muhammad Teguh Setiawan

ABSTRACT

The aim of this research was to prove the GDF-9 could induce Anti GDF-9 depend on the colour gradation of nitrocellulose membrane with dot blot method on male local rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Bovine ovary was collected from slaughter house washed with NaCl. Oocyte collected from antral follicle using aspiration technique. The GDF-9 protein was isolated from oocyte and used for producing the antibody for dot blotting method. Four male rabbit received subcutan injection of 150 µl GDF-9 antigen with CFA (immunization) 2 days after pre-imun. Rabbit received booster doses at 2nd week and 2 days after 7th week (5th bleeding). The dot blot result showed depend on dot colour gradation. The highest scoring titer of antibody at 6th week (4th bleeding), and 11th week (9th bleeding) which the score was six

Keyword : GDF-9, antral follicle, dot blotting

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan berkah, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Uji Spesifitas Protein GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*)** pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel antral dengan metode Dot blot.

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Prof. Romziah Sidik, Ph.D., drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Ibu Dr. Widjiati, Msi., drh selaku pembimbing pertama dan Bapak Moh. Sukmanadi, M.Kes., drh selaku pembimbing kedua serta Bapak Prof. Mas'ud Hariadi, Ph.D, M. Phill., drh. selaku ketua penguji, Ibu Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, M.Si., drh. selaku sekretaris penguji dan Ibu Gracia Angelina H, M.Si., drh. selaku anggota penguji atas semua saran, kritikan dan bimbingannya sampai dengan selesainya skripsi ini.
2. Bapak Moh. Sukmanadi, M. kes., drh selaku dosen wali, seluruh dosen pengajar Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan ilmu selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Ibu Dr. Widjiati, Msi., drh selaku kepala proyek dan dosen pembimbing penelitian yang telah banyak membantu selama penelitian sampai dengan selesainya penyusunan skripsi ini.
3. Keluargaku tercinta, kedua orang tuaku : bapak Achmad Fachruddin dan ibunda Sri Setyowati serta adik-adikku atas kasih sayang dan doa yang tiada

henti. Kakek-nenek dan saudara-saudaraku tercinta yang telah memberikan bantuan, doa, dorongan dan semangat.

4. Rekan-rekan penelitian Antok, Zaenal, Mbak Yayoh, teman-teman angkatan 2004 Antok, Tanta, Safri, Arfi, Zaenal, Erik, Andrew, Serta bapak Pomo (staf laboratorium in vitro) Universitas Airlangga, Mbak Ima (staf Laboratorium Biologi Molekuler) atas bantuan dalam pelaksanaan uji Dot blot di Laboratorium Biologi Molekuler Universitas Brawijaya serta semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak memberikan bantuan kepada penulis.

Surabaya, April 2009

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN IDENTITAS	iv
ABSTRACT.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG.....	xiv
BAB I : PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang.....	1
1.2 Rumusan masalah.....	2
1.3 Landasan teori.....	3
1.4 Tujuan penelitian.....	5
1.5 Manfaat penelitian.....	5
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ovarium.....	6
2.2 Folikulogenesis.....	7
2.3 Folikel Antral.....	8
2.4 Growth Differentiation Factor (GDF-9).....	11
2.5 Dot Blot.....	13
BAB III : MATERI DAN METODE	
3.1 Waktu dan tempat.....	16
3.2 Materi penelitian.....	16
3.2.1 Bahan penelitian.....	16
3.2.2 Alat penelitian.....	16
3.2.3 Media penelitian.....	17
3.3 Metode penelitian.....	17
3.3.1 Metode Dot Blot.....	17
3.4 Prosedur penelitian.....	18
3.4.1 Aspirasi Oosit.....	18
3.4.2 Isolasi dan Purifikasi protein.....	19
3.4.3 Purifikasi isolat GDF-9 dengan elektroelusi.....	19
3.4.4 Imunisasi hewan coba dengan isolat GDF-9	20

3.4.5 Koleksi Sample Serum Darah Kelinci	21
3.4.6 Purifikasi serum.....	23
3.4.7 Uji Dot Blot.....	23
3.5 Analisis data.....	24
 BAB IV : HASIL PENELITIAN.....	 26
BAB V : PEMBAHASAN.....	28
BAB VI : KESIMPULAN DAN SARAN.....	31
RINGKASAN.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
3.1 Skor Penilaian Dot pada membran nitroselulosa.....	24
4.1 Pembacaan skor hasil dot blot.....	27

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Folikel Antral pada oosit.....	11
2.2 Skema dot blot.....	15
3.1 Skema Penelitian.....	22
3.2 Kerangka Penelitian.....	25
4.1 Hasil Blotting dari serum darah kelinci yang mengandung protein GDF-9 dengan menggunakan metode <i>dot blot</i>	26

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Isolasi Protein.....	36
2. Elektroelusi.....	37
3. Metode Dot Blotting.....	38
4. Alat-alat Penelitian.....	39

SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CFA	<i>Complete Freund Adjuvant</i>
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
GDF-9	<i>Growth Differentiation Factor-9</i>
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i>
IFA	<i>Incomplete Freund Adjuvant</i>
LH	<i>Luteinizing Hormone</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PBST	<i>Phosphat Buffer Saline Tween</i>
PMSF	<i>Phenylmethene Sulfonil Fluoride</i>
PVDF	<i>Polyvinildenodifluoride</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TCM-199	<i>Tissue Culture Medium-199</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sapi merupakan salah satu jenis ternak yang cukup potensial dikembangkan untuk mencukupi kebutuhan protein hewani. Dalam rangka meningkatkan produktivitas ternak terdapat banyak teknik fertilisasi salah satu adalah dengan *in vitro fertilization* (IVF). Namun kendala yang dialami saat ini adalah tingkat keberhasilan IVF belum optimum. Masalah ini perlu dikaji secara molekuler reproduksi, mengingat banyak protein diduga berperan dalam proses pematangan oosit dan sampai saat ini sintesis dan fungsi protein tersebut secara molekuler masih belum banyak diketahui (Pawshe, *et al* 1996).

Perkembangan ovarium mamalia ditandai oleh perkembangan folikel primordial yang 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 juga dipengaruhi oleh faktor lokal yang ada di oosit, antara lain adalah *Growth Factor* yang berperan dalam peningkatan proliferasi dan diferensiasi sel granulosa, sehingga menyebabkan terjadinya ekspansi cumulus, meski demikian peran sesungguhnya dari faktor lokal oosit ini belum dikaji secara mendalam (Widjiati, 2007).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) merupakan salah satu *Growth Factor* yang ikut berperan dalam proses perkembangan oosit, mempengaruhi berbagai sel ovarium termasuk untuk melakukan sintesis DNA pada membran sel

granulosa dan proses penurunan cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung. GDF-9 mempunyai kemampuan merangsang proliferasi sel granulosa dan menghambat diferensiasinya, kekurangan GDF-9 akan menyebabkan perkembangan folikel terhenti, tidak adanya lapisan sel teka disekeliling folikel, serta berkurangnya kemampuan pembelahan meiosis pada oosit (Vitt *et al.*, 2002).

Beberapa studi telah menunjukkan bahwa GDF-9 merupakan stimulator pada saat perkembangan folikel primer serta peran dan fungsi GDF-9 pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel antral dan folikel preantral. Transkripsi dari protein GDF-9 m-RNA ini diekspresikan pada oosit primer, yang terdapat pada folikel di mencit, tikus, dan manusia. Keberadaan GDF-9 ini pada folikel stadium *antral* dan *preantral* dapat berpengaruh besar terhadap perkembangan folikel pada tahap tersebut. (Nilsson *et al.*, 2002).

Mengingat pentingnya peran dari GDF-9 pada proses folikulogenesis yang sangat berguna untuk menghasilkan oosit, maka dilakukan penelitian ini yang bertujuan untuk menguji spesifitas protein GDF-9 pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel antral dan uji spesifitasnya menggunakan metode dot blot.

Metode dot blot ini merupakan suatu metode pengujian yang mudah untuk menentukan keberadaan antigen sehingga mempermudah untuk mengidentifikasi terhadap spesifitas protein dengan antibodi.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan di atas maka dapat dirumuskan permasalahan apakah terdapat spesifitas reaksi protein *Growth*

Differentiation Factor-9 (GDF-9) dari folikel antral terhadap antibodi poliklonal kelinci dengan metode dot blot?

1.3. Landasan Teori

Rendahnya produksi embrio *in vitro* disebabkan oleh beberapa faktor yaitu kualitas oosit, spermatozoa, dan media kultur. Pada perkembangan oosit diketahui banyak sekali faktor yang berperan pada tahap awal sampai tahap maturasi. Diantara faktor yang ikut berperan adalah hormon, beberapa growth factor juga diperlukan untuk merangsang folikel ovarium. Pada saat perkembangan folikel primer juga terlihat perubahan pada oosit. Selama periode preantral, diameter oosit meningkat dari 25 μ m - 120 μ m. Faktor lainnya yang terlihat pada saat perkembangan oosit adalah *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9).

Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) adalah suatu protein superfamili dari *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β), yang disekresikan oleh oosit dan kekurangan GDF-9 menyebabkan perkembangan folikel terhenti (Elvin *et al.*, 2000).

Proliferasi dan diferensiasi sel granulosa ovum dipengaruhi oleh *Gonadotropin* sama banyak dengan parakrin yang disekresi oleh oosit dan sel somatik yang mengelilinginya. Berbeda dengan banyak anggota subfamili *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) lainnya yang sudah nampak peran dan fungsinya pada sel somatik ovum, peran *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) hanya dibatasi pada saat perkembangan folikel primer dan folikel besar (Mazerbourg *et al.*, 2003).

Banyak penelitian telah membuktikan pentingnya peran *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) sebagai stimulator pada saat perkembangan folikel primer. Dengan penambahan *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) juga dibuktikan adanya laju pertumbuhan folikel primer dan folikel preantral pada saat *in vitro* dan *in vivo*. *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) telah dibuktikan peran dan fungsinya pada saat perkembangan sel granulosa pada folikel preantral dan folikel antral. *Growth Differentiation Factor-9* (GDF-9) juga mempengaruhi berbagai fungsi sel ovari termasuk sintesis DNA sel granulosa dan proses steroidogenesis (Jayawardana *et al.*, 2006).

Frandsen (1992) menyebutkan bahwa *growth factor* mempunyai pengaruh penting dalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel, hal ini disebabkan karena *growth factor* berperan dalam meningkatkan transpor asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam-asam amino sehingga membentuk protein.

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah memperoleh data spesifitas *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel antral secara *in vitro* dengan metode Dot Blot.

1.5. Manfaat Penelitian

- a. Memperoleh informasi data karakteristik tentang *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) pada oosit sapi secara *in vitro*.

- b. Memberikan wawasan tentang peran *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) dalam memacu proses pematangan oosit.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ovarium

Ovarium adalah organ reproduksi sapi betina, pada umumnya ovarium terdapat dua buah, kanan dan kiri yang terletak dalam rongga pelvis. Pada mamalia, ovarium mempunyai dua fungsi utama yaitu fungsi reproduktif dalam menghasilkan sel telur (ovum) dan fungsi endokrinologis dalam menghasilkan hormon estrogen, progesteron, dan relaksin (Ismudiono, 1999).

Ovarium merupakan organ kelamin yang bertanggung jawab atas diferensiasi dan pelepasan oosit matang untuk fertilisasi dan perkembangbiakan dari spesies. Ovarium sebagai organ endokrin yang memproduksi hormon steroid yang memungkinkan berkembangnya ciri-ciri seksual betina sekunder dan mendukung kebuntingan (Mayes, 2002).

Struktur ovarium sangat bervariasi, tergantung pada spesies, umur dan tahap siklus seksual. Ovarium berbentuk lonjong dan pada potongan memanjang tampak korteks dan medulla. Ovarium sapi berbentuk ovoid dan kira-kira berukuran 4 x 2 x 1,5 cm (Mayes, 2002).

Ovarium terdiri dari medulla dan korteks, medulla merupakan bagian dalam dari ovarium yang banyak mengandung saraf, pembuluh darah dan pembuluh limfe yang terdiri dari jaringan ikat fibroelastis yang tidak teratur. Korteks merupakan daerah tepi yang lebar, mengandung folikel dan korpus luteum, dan dibalut oleh epitel. Stroma korteks berupa jaringan ikat longgar. Sel-sel jaringan ikat dengan permukaan tersusun berada tepat dibawah epitel

permukaan dan agak lebih padat dari pada sel-sel yang terletak mengarah medulla, lapisan padat ini dikenal sebagai tunika albugenia. Tunika albugenia dapat menipis dan bahkan menghilang karena terdesak oleh perkembangan folikel ovarium serta korpus luteum selama aktivitas ovarium meningkat (Dellman dan Brown, 1992).

2.2 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 (Glitser *et al*, 2003).

Peran utama dari folikel adalah sebagai penyokong oosit. Folikel pada ovarium berasal dari epitel benih yang melapisi permukaan ovarium. Menurut Partodihardjo (1992) pertumbuhan folikel terbagi menjadi tiga tahap. Pada tahap pertama terjadi pada hewan betina yang masih dalam kandungan dan setelah hewan dilahirkan. Sel tersebut menjadi ovum yang berada di tengah dikelilingi oleh sel-sel granulosa, folikel primer terletak di tengah permukaan ovarium. Pada tahap ini folikel yang berasal dari satu sel epitel benih yang membelah diri (Ismudiono, 1999). Folikel tersebut berdiameter sekitar 30 μm , dikelilingi oleh sel-sel granulosa yang berbentuk kubus (Mayes, 2002).

Pada tahap kedua terjadi pada waktu hewan betina telah lahir dan menjalani proses pendewasaan tubuh. Ovum akan mempunyai selaput dan

terdapat membran yang disebut zona pelusida yang kemudian disebut sebagai folikel sekunder.

Tahap ketiga terjadi pada waktu hewan menjadi dewasa dan mengalami siklus birahi. Pada tahapan ini folikel sekunder berkembang menjadi tersier (folikel antral) yang ditandai dengan semakin banyaknya sel-sel granulosa dan adanya antrum yang berisi cairan folikel. (Mayes, 2002). Pertumbuhan ini dilanjutkan sampai folikel mencapai besar yang maksimal disebut dengan folikel *de graaf*.

2.3. Folikel Antral

Selain epitel permukaan terdapat tiga sub unit fungsional ovarium adalah folikel, korpus luteum dan stroma. Folikel yang sedang tumbuh diselubungi oleh lapisan jaringan berasal dari stroma. Pertumbuhan dan pematangan itu berasal dari siklus yang konstan dan terjadi secara berkala (Yatim, 1994).

Jaringan dasar ovarium disebut *stroma*, mengandung serat jaringan ikat, otot polos, dan pembuluh darah yang bergelung-gelung banyak. Badan ovarium terdiri dari 2 (dua) daerah, yaitu : *cortex* dan *medulla*. *Cortex* langsung di sebelah dalam tunika albuginea, menyelubungi *medulla*. Dalam *stroma cortex* terdapat banyak folikel yang terdiri dari oosit yang diselubungi sel-sel folikel. Ada 5 (lima) macam folikel di *cortex*, yaitu : folikel muda, folikel primer, folikel sekunder, folikel tertier, dan folikel *de graaf*.

Folikel muda terdiri dari oosit besar diselaputi selapis sel-sel folikel yang gepeng, kebanyakan folikel muda bergerombol di pinggir cortex, persis di bawah tunika albugenia.

Folikel primer oositnya membesar, sel folikel jadi kubus atau batang. Oosit primer menempuh meiosis I sampai tahap *Leptoten profase*. Folikel ini memiliki oosit yang besar, sel folikel jadi kubus atau batang lalu mitosis berulang-ulang membentuk sel-sel granulosa yang terdiri dari beberapa lapis. Ada pigmen lipokrom dalam ooplasma, banyak butir lemak, banyak ribosom bebas, oosit membentuk mikrovili sedangkan sel granulosa yang meliputi membentuk filopodia, tonjolan-tonjolan halus yang panjang ke arah oosit. Oosit dan granulosa sebelah luarnya membentuk *zona pellucida*, selaput oosit yang terdiri dari bahan amorf dan tak mengandung sel sama sekali. Mikrovili dan filopodia berinterdigitasi dengan *zona pellucida*. Filopodia sebagai penyalur bahan nutrisi dari tubuh induk (ovarium) ke oosit disebabkan filopodia jauh lebih panjang dan dapat mencapai membran 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 (Yatim, 1994).

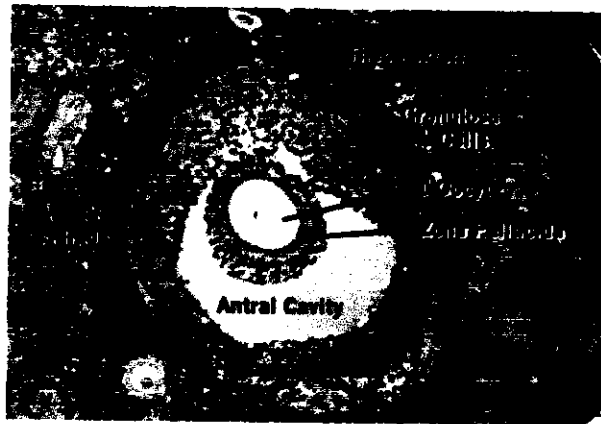
Folikel sekunder oositnya mencapai besar maksimal dan letaknya eksentrik dalam folikel. Folikel ini menempuh meiosis I sampai tahap diploten profase. Sel granulosa terdiri dari 6-12 lapis sel (Yatim, 1994). Folikel sekunder mengandung dua lapis sel-sel granulosa dan oosit berdiameter antara

50 μm sampai 60 μm yang ditandai oleh berkembangnya 3 μm sampai 5 μm lapis glikoprotein tebal disebut zona pelusida yang mengitari membran plasma oosit. Zona pelusida dihasilkan oleh sel-sel granulosa yang langsung mengitari oosit dan sebagian oosit itu sendiri. Hanya sebagian saja folikel primer berubah menjadi folikel sekunder. (Mayes, 2002).

Folikel tersier atau disebut juga folikel antral. Folikel tersier terjadi pada saat terbentuk rongga dalam folikel, disebut *antrum* yang berisi cairan folikel yang disebut *liquor folliculi* dengan diameter 10mm (Yatim, 1994). Folikel tertier berasal dari folikel sekunder yang ditandai dengan banyaknya sel-sel granulosa sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan. Oosit primer pada folikel tertier berbentuk bulat berdiameter 150 μm sampai 300 μm tergantung spesies, inti terletak di tengah dengan jalinan kromatin tipis dan nukleus jelas (Mayes, 2002).

Folikel *de graff* oositnya diselaputi beberapa lapis sel granulosa berada dalam suatu tonjolan ke dalam *antrum*, tonjolan ini disebut *cumulus oophorus*. Tonjolan ini lepas keluar ovarium pada saat ovulasi dan sel granulosa sekeliling oosit disebut *corona radiata*. Oosit ini 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 apabila ovum dibuahi (Yatim, 1994). Folikel *de graff* berkembang terus diikuti oleh perkembangan inti dan sitoplasma ovum, pada tahap pematangan ini terjadi sekresi hormone estrogen yang dihasilkan oleh sel teka. Sel teka akan merangsang pelepasan *Luteinizing Hormone* (LH) yang akan menggertak

terjadinya ovulasi. Saat terjadi pelepasan *polar body* I maka ovum memasuki pembelahan meiosis II (Hafez, 2000). Selama folikel mengalami perkembangan, ovum tetap berada pada tingkat awal pembelahan heterotop. Menjelang ovulasi dan sel cumulus telah terlepas mulailah tingkat akhir pendewasaan ovum (Ismudiono, 1999).



Gambar 2.1 Folikel Antral pada oosit

2.4 Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9)

Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) adalah salah satu protein growth factor yang termasuk anggota superfamili dari *Transforming Growth Factor* β (TGF β) pada sel oosit yang termasuk diantaranya adalah TGF- β , activin, dan bone morphogenic protein (BMPs). GDF-9 merupakan factor differensiasi dan pertumbuhan sama halnya dengan *Transforming Groth Factor* β (TGF β), *Mullerian Inhibitory Substance* (MIS), *Activin* dan *Inhibin* (Thomas, *et al.*, 2003).

Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) ini terdiri dari 454 asam amino dan mempunyai berat molekul 51.444 Da (51 kDa), ditemukan pertama kali pada awal tahun 1990 sebagai anggota *Transforming Growth Factor* β

(TGF- β) (Vitt *et al.*, 2002). Ditemukan pada ovarium rodensia (Hayashi *et al.*, 1999), pada sapi dan kambing (Bodensteiner *et al.*, 1999), pada ovarium babi dan juga pada manusia (Aaltonen *et al.*, 1999).

Pada tikus betina GDF-9 sangat dibutuhkan pada perkembangan 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 (Vitt *et al.*, 2002). Suplementasi GDF-9 dalam medium biakan memungkinkan terjadinya ekspansi kumulus dan peningkatan reseptor LH dalam sel-sel granulosa. Mekanisme kerja GDF-9 dan LH adalah akan menurunkan cAMP sehingga akan merangsang perluasan kumulus kompleks oosit dan memproduksi asam hialuronat yang dapat diindikasi pada oosit yang telah matang. Perubahan mekanisme kerja dari GDF-9 pada sel-sel granulosa akan mengubah lingkungan mikro intra folikular, yang akan berpengaruh pada kemampuan oosit untuk berkembang menjadi embrio praimplantasi yang normal secara morfologis (Yang and Roy, 2001).

GDF-9 sangat berperan penting pada perkembangan sel granulosa dan sel theca, yang berperan penting juga pada differensiasi dan maturasi pada sel oosit. GDF-9 memiliki kaitan didalam proses tingkat perbedaan ovulasi dan dalam penghentian fungsi ovarium prematur, oleh karena itu GDF-9 memiliki

peran yang sangat penting dalam kesuburan oosit dan kekurangan GDF-9 akan menyebabkan perkembangan folikel terhenti.

Mengingat pentingnya peran protein dalam menjaga kualitas oosit untuk dipakai dalam produksi *in vitro* dan pencarian metode alternatif untuk deteksi kualitas embrio berdasarkan profil protein pada dominan folikel oosit sapi. Telah diketahui bahwa GDF-9 mempengaruhi berbagai sel ovari termasuk sintesis DNA pada membran sel granulosa dan proses cAMP sehingga proses meiosis dapat berlangsung (Vitt *et al.*, 2002).

2.5. Dot Blot

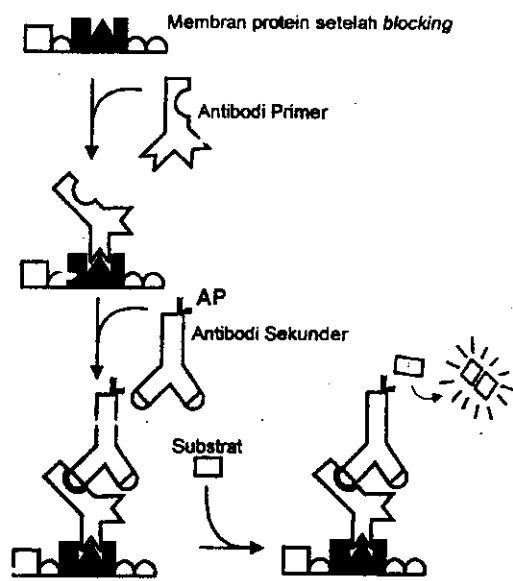
Blotting merupakan teknik untuk mentransfer pita protein, DNA atau RNA dari gel hasil elektroforesis ke matrik membran (biasanya dipakai nitroselulosa, PVDF atau nilon). Matrik inilah yang mengikat molekul yang ditransfer.

Metode imunoblotting dilakukan untuk identifikasi dan klasifikasi terhadap spesifitas protein dan antibodinya. Metode ini merupakan kelanjutan identifikasi protein dengan metode elektroforesis, karena khususnya metode western blot (WB) didahului dengan running gel dengan SDS-PAGE yang dilanjutkan transfer protein pada membran, yaitu PVDF (*Polyvinildenedifluoride*) maupun *nitrocellulose* (NC). Selain metode WB juga dikenal metode dot blot (Aulanni'am, 2004).

Dot blotting merupakan suatu metode pengujian yang mudah untuk mendeteksi keberadaan antigen. Metode ini lebih cepat karena tanpa didahului

SDS-PAGE, melainkan protein yang diuji langsung ditetaskan pada membran. Sampel yang berisi antigen ditetaskan pada membran, diuji dengan antibodi hasil produksi hewan coba yang telah diimunisasi dengan antigen. Tidak seperti pada elektroforesis, *Dot Blot* hanya memberikan informasi tentang keberadaan antigen, tidak untuk menentukan berat molekul. *Dot Blot* juga digunakan untuk menentukan secara cepat konsentrasi optimal antigen dan pelabelan antibodi yang digunakan dalam *Western Blott* (goers, 1993).

Membran yang dipakai dalam metode *Dot Blotting* biasanya adalah nitroselulosa karena membran ini mempunyai kapasitas pengikatan yang tinggi, sedangkan untuk membran yang lain seperti membran nilon atau PVDF (*Polyvinildenodifluoride*) memiliki beberapa kelemahan yaitu untuk membran nilon apabila protein yang akan diuji bersifat hidrofobik maka akan mempunyai daya ikat yang lemah. Membran PVDF mempunyai daya pengikat yang tinggi tetapi agak kesulitan dalam transfer protein bila dibandingkan dengan membran nitroselulosa (Goers, 1993).



Gambar 2.2 Skema Dot Blot (Sumber Aulanni'am, 2005)

BAB 3

MATERI DAN METODE

BAB III MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan kurang lebih delapan bulan dimulai November 2007 sampai dengan Juli 2008 yang dikerjakan di dua laboratorium yaitu laboratorium fertilisasi In Vitro (IVF) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya.

3.2. Materi Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari limbah Rumah Potong Hewan. Bahan kimia yang diperlukan antara lain : Aquades, Antibodi sekunder (Promega Product Information Anti Rabbit IgG (Fc), AP Cojugate catalog $\neq$ S 3731 Promega USA size 100 μ l); *Phenylmethene Sufonil Flouoride* (PMSF); Western Blue ® Stabilized (Substrate for Alkaline Phosphate Cat $\neq$ S 3731 Promega USA size 100 μ l); Tris HCl; (NH₄)₂SO₄; Tris Base; Commasive Brilliant Blue; PBS Skim; akrilamid; bisakrilamid; Tween-20 (Mengandung Polyoxyethylen Sorbitan monolaurat art : 822184 Merck-Schuchardt München).

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan antara lain adalah : Spuit disposable 10 cc (Merk One Med), cawan petri disposable (Merk Falcon), pipet pasteur, pipet eppendorf,

tabung eppendorf, sentrifuge (Merk Medifuge), mikroskop Inverted (Merk Meiji), freezer, inkubator, tabung Erlenmeyer, selang infus, mikropipet 20 μ L, 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L; membran nitroselulosa (Hybond™ Cpure Nitro cellulose Membran Amersham Life Science England), *dot blotter* (Biodot® Aparatus buatan BIORAD-USA), vortex, shaker (model VRN-2000).

3.2.3 Media Penelitian

Media yang dipakai dalam penelitian ini adalah :

Media *Phosphate Buffer Saline* (PBS), NaCl Fisiologis, Antibiotik Gentamisin, *Bovine Serum Albumin* (BSA).

Untuk keperluan imunisasi GDF-9 membutuhkan hewan coba berupa 4 ekor kelinci lokal jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang berumur 8 bulan, berat badan 3-4 kg. Bahan yang digunakan adalah protein GDF-9 yang sudah diidentifikasi menggunakan antibodi monoklonal anti GDF-9.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1 Metode Dot Blott

Dot blotting merupakan suatu metode pengujian yang mudah untuk mendeteksi keberadaan antigen, protein yang diuji langsung ditetaskan pada membran. Sampel yang berisi antigen ditetaskan pada membran nitroselulosa, diuji dengan antibodi hasil produksi hewan coba yang telah diimunisasi dengan antigen. Tidak seperti pada elektroforesis, *Dot Blot* hanya memberikan informasi tentang keberadaan antigen, tidak untuk menentukan berat molekul. *Dot Blot* juga

digunakan untuk menentukan secara cepat konsentrasi optimal antigen dan pelabelan antibodi.

3.4. Prosedur penelitian

3.4.1 Aspirasi oosit

1. Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan sebelumnya dibersihkan dulu dari darah dan lemak. Kemudian dicuci dengan larutan PZ, ovarium tersebut dimasukkan kedalam botol yang sudah diisi media pembawa berupa NaCl 0,89% dan Gentamisin sulfat 50 µg/ml.
2. Ovarium yang berasal dari RPH dicuci dengan NaCl fisiologis yang diberi gentamycin sulfat diulang beberapa kali pencucian hingga cairan pencuci menjadi jernih.
3. Oosit dikoleksi dengan teknik aspirasi menggunakan jarum ukuran 18G yang dihubungkan dengan spuit 10 ml yang berisi 1 ml PBS yang diberikan tambahan 0,3% BSA dan 50 µg/ml gentamycin sulfat.
4. Aspirasi dilakukan pada folikel yang jernih dan berdasarkan ukuran diameter folikel dengan diameter permukaan enam sampai delapan milimeter yang termasuk folikel ukuran besar atau folikel antral, pengukuran diameter permukaan menggunakan jangka sorong.
5. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak tiga kali di dalam medium PBS dan dua kali di dalam TCM-199.
6. Oosit kemudian dipisahkan dari sel granulosa dengan menggunakan pipet pasteur dibawah mikroskop inverted.

3.4.2 Isolasi dan Purifikasi protein

Oosit ditambah dengan larutan PBST-PMSF 4 mM sebanyak lima kali volume sampel kemudian disonifikasi selama 10 menit dan disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit dengan suhu 4°C. Supernatan ditambahkan dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1, kemudian masuk refrigerator selama 30 menit. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan yang diperoleh dimasukkan kedalam freezer selama lima menit. Pelet dikeringanginkan dan ditambah buffer 20 mM Tris-Cl pH 6,8. Sampel dapat disimpan di freezer dengan suhu -20°C.

3.4.3 Purifikasi isolat GDF-9 dengan elektroelusi

Elektroelusi adalah metode untuk memisahkan antara molekul inhibin dengan protein lainnya dengan cara memasukkan gel hasil elektroforesis yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita dengan berat molekul target (sebelumnya telah di konfirmasi dengan metode *western blotting*). Potongan gel dimasukkan kedalam kantong selofan dan ditambahkan 0,02 M buffer fosfat hingga terendam. Kantong selofan kemudian dimasukkan ke dalam chamber elektroelusi yang mengandung 0,01 M buffer fosfat, kantong selofan diposisikan terendam buffer fosfat. Elektroelusi dilakukan didalam cool chamber 4°C, pada 250 V, 20 mA selama semalam.

Protein yang terelusi diperoleh dengan presipitasi cairan elusi pada kantong selofan. Presipitasi dilakukan dengan menambahkan 97 % etanol dingin dan diinkubasikan selama semalam, pada suhu 4°C. Sampel kemudian disentrifus

pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Pelet yang diperoleh dikeringanginkan dan ditambah dengan buffer. Selanjutnya sampel dapat disimpan pada suhu -20°C

3.4.4 Imunisasi hewan coba dengan isolat GDF-9

Oosit yang telah dikoleksi dilarutkan di dalam larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang telah ditambah 0.05 mM *Phenylmethene Sulfonyl Flouride* (PMSF) yang berfungsi sebagai inhibitor. Setelah itu oosit dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dengan (2-4°C) steril, dengan cara memindahkan oosit ke dalam cawan petri yang sudah berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS).

Selanjutnya oosit dipindah ke dalam larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Oosit dimasukkan ke dalam eppendorf yang sudah berisi *Phosphate Buffer Saline* (PBS) mengandung EDTA dan Tween 100 dan divortek, kemudian di sentrifus dengan kecepatan 6000 rpm 4°C selama 30 menit. Supernatan ditampung sebagai fraksi protein oosit (fpO) selanjutnya ditambah 20 mM Tris-Cl 200µl dan disimpan dalam freezer suhu -10°C dan siap digunakan sebagai bahan isolat fp.

Imunisasi dilakukan pada kelinci dengan menyuntikkan protein spesifik GDF-9 hasil isolasi tersebut secara sub kutan dengan dosis 150 µl isolat GDF-9 dengan ditambahkan 150 µl adjuvant. Imunisasi pertama dilakukan dua hari setelah pengambilan darah pre-imun dengan menambahkan CFA untuk merangsang pembentukan antibody terhadap GDF-9 dan satu minggu kemudian kelinci diimunisasi ulang (Booster I) dengan menambahkan IFA untuk

meningkatkan respon imun hewan coba. Booster II dilakukan dua hari setelah melakukan pengambilan darah kelima.

3.4.5 Koleksi Sampel Serum Darah kelinci

Pengambilan darah kelinci untuk mendapatkan serum yang mengandung antibodi dilakukan pada :

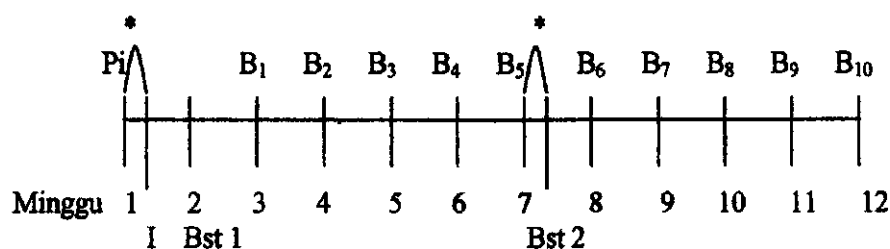
- Minggu ke-1 sebagai pengambilan darah Pi (Pre imun)

Dua hari setelah Pre-imun dilakukan imunisasi dengan menyuntikkan isolat GDF-9 ditambahkan CFA,

- Minggu ke-2 dilakukan Imunisasi ulang dengan menambahkan IFA (Booster I),
- Minggu ke-3 pengambilan darah ke-1,
- Minggu ke-4 pengambilan darah ke-2,
- Minggu ke-5 pengambilan darah ke-3,
- Minggu ke-6 pengambilan darah ke-4,
- Minggu ke-7 pengambilan darah ke-5,

Dua hari setelah pengambilan darah dilakukan Imunisasi ulang dengan menambahkan IFA (Booster II),

- Minggu ke-8 pengambilan darah ke-6,
- Minggu ke-9 pengambilan darah ke-7,
- Minggu ke-10 pengambilan darah ke-8,
- Minggu ke-11 pengambilan darah ke-9,
- Minggu ke-12 pengambilan darah ke-10.



Gambar 3.1 Skema Penelitian

Keterangan :

Pi : Pengambilan darah pre-imun

I : Imunisasi menggunakan CFA

Bst 1,2 : Booster 1,2 dengan menggunakan IFA

B₁, B₂, ... B₁₀ : Pengambilan darah ke-

* : 2 hari

Pengambilan darah pada kelinci dilakukan melalui vena aurikularis sebanyak 5 ml dengan menggunakan spuit syringe disposable 5 ml dan jarum ukuran 18-G, kemudian darah dimasukkan kedalam tabung reaksi, tunggu hingga darah mengental sekitar ± 15 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm dengan suhu 20°C selama 10 menit untuk mendapatkan serum. Karena dalam pengujian dot blot menggunakan metode duplo maka serum yang didapat tersebut di bagi dua dan masing-masing dimasukkan kedalam tabung eppendorf. Serum dipindahkan menggunakan pipet dan disimpan pada suhu -20°C atau dalam freezer sebelum digunakan untuk uji dot blot.

3.4.6 Purifikasi serum

Serum didapatkan dari koleksi sampel darah kelinci, kemudian dilakukan purifikasi sebelum dilakukan uji dot blot. Sampel darah kelinci diambil melalui vena aurikularis sebanyak 5 ml kemudian darah dimasukkan kedalam tabung reaksi, tunggu hingga darah mengental sekitar $\pm$ 15 menit, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan supernatan. Pemurnian antibodi dilakukan dengan presipitasi amonium sulfat dengan kejenuhan 50%.

3.4.7 Uji Dot Blot

Metode ini dilakukan tanpa didahului running SDS-PAGE sehingga protein yang diuji ditotolkan pada membran yang sudah dipasang didalam *dotblotter*.

Protein yang diuji dilarutkan dalam PBS mengandung NaN_3 (1 mL Na-Azida 1 % + 9 mL PBS), kemudian ditetaskan pada membrane nitroselulosa yang telah dibasahi dengan PBS. Membran dipasangkan pada alat dotblotter dan sample ditotolkan @ 50 μL , alat dot blotter kemudian dibloking dengan bloking buffer selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 (3 menit yang diulang selama 3 kali). Hasilnya kemudian diinkubasi dengan serum (antibody primer, 1/100 – 1/250) dalam PBS-Skim Milk 1 % selama 2 jam.

Selanjutnya dilakukan pencucian dengan PBS-Tween 20 0,05% (3 menit yang diulang selama 3 kali). Hasilnya kemudian diinkubasi kembali dengan antibody sekunder (conjugate alkalinfosfatase ataupun SA-HRP) selama 1 jam

dan dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05% (3 menit yang diulang selama 3 kali), kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat *Western Blue* dan dikeringkan pada suhu kamar.

Penilaian terhadap munculnya warna pada dot blot dipermudah dengan menggunakan kategori skor dari nol sampai dengan enam. Nilai nol adalah tanda negatif dan nilai satu hingga enam adalah tanda positif. Nilai satu adalah nilai positif terendah, sedangkan nilai enam merupakan nilai positif tertinggi yang didasarkan oleh semakin gelapnya noda yang terbentuk.

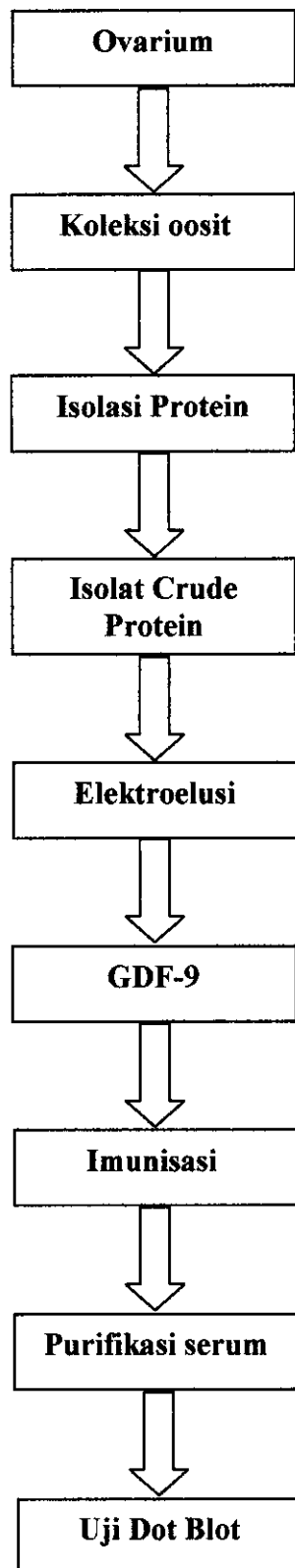
Tabel 3.1 Skor Penilaian Dot pada Membran Nitroselulose

Skor penelitian	Penilaian dot pada membran nitroselulosa	Definisi skor penelitian	
		Brightness	Contrass
Skor 0	Negatif (-)	50%	50%
Skor 1	Positif lemah	51%-60%	100%
Skor 2	Positif lemah *	61%-65%	100%
Skor 3	Positif sedang	66%-75%	100%
Skor 4	Positif sedang *	76%-82%	100%
Skor 5	Positif kuat	83%-90%	100%
Skor 6	Positif kuat *	91%-94%	100%

Keterangan : (*) kualitas lebih baik pada penilaian dot yang sama

3.5 Analisis Data

Analisis data berdasarkan data-data yang diperoleh kemudian dianalisis secara deskriptif



Gambar 3.2 Kerangka Penelitian

BAB 4

HASIL PENELITIAN

BAB IV HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian uji spesifitas serum tersebut diuji dengan menggunakan metode dot blot dari hasil koleksi sampel darah yang dilakukan pada ke empat kelinci dengan 10 kali pengambilan darah dan preimun. Hasil dari metode dot blot yang didapatkan 44 sera dapat dilihat pada gambar 4.1 dibawah ini.

		Pengambilan darah ke-										
		Pi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Isolat GDF-9	K1											
	K2											
	K3											
	K4											

Gambar 4.1 Hasil Blotting dari serum darah kelinci yang mengandung protein GDF-9 dengan menggunakan metode *dot blot*.

Antibodi primer yang digunakan untuk uji dot blot berasal dari serum empat ekor kelinci jantan yang disuntik dengan isolat GDF-9. Anti GDF-9 diproduksi dengan menginduksi isolat GDF-9 kepada hewan coba ditambah dengan CFA sebagai adjuvant, Anti GDF-9 yang diperoleh merupakan antibodi poliklonal.

Minggu ke-satu sebagai pre-imun kemudian dua hari setelah pre-imun dilakukan imunisasi dengan menggunakan CFA, kemudian pada minggu kedua dilakukan imunisasi lagi dengan menambahkan isolat GDF-9 ditambah IFA (digunakan sebagai booster pertama). Setiap satu minggu dilakukan pengambilan darah selama lima minggu. Dua hari setelah pengambilan darah terakhir atau pada

minggu ketujuh dilakukan booster kedua dengan menambahkan IFA sebagai adjuvant dan kemudian darah diambil tiap minggu selama lima minggu berturut-turut.

Pembacaan pada membran nitroselulosa diatas akan lebih mudah dianalisa apabila dibuat skor penilaian berdasarkan gradasi kegelapan warna dot pada membran. Tabel 4.1 di bawah ini adalah skoring warna dot untuk dapat menentukan grafik peningkatan antibodi terhadap GDF-9 sehingga dapat diketahui puncak kadar antibodi GDF-9.

	Skor pengambilan darah ke-										
	Pi	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kelinci 1	0	1	2	3	6	2	1	3	5	6	2
Kelinci 2	0	1	2	3	6	2	1	3	5	6	2
Kelinci 3	0	1	2	3	6	2	1	3	5	6	2
Kelinci 4	0	1	2	3	6	2	1	3	5	6	2

Tabel 4.1 Pembacaan skor hasil dot blot

Hasil skoring diatas menunjukkan adanya peningkatan respon imun dari kelinci local jantan (*Oryctolagus cuniculus*) yang telah diimunisasi terhadap GDF-9. Pada *booster* pertama pada minggu kedua terjadi peningkatan respon imun secara bertahap dan mencapai puncaknya pada minggu keempat selanjutnya skor menurun, kemudian naik lagi pada minggu kesembilan pengambilan darah yang disebabkan adanya *booster* kedua pada minggu ketujuh.

BAB 5

PEMBAHASAN

BAB V PEMBAHASAN

Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) adalah suatu protein yang ditemukan pada ovarium rodensia, sapi, kambing dan juga pada manusia merupakan salah satu protein growth factor anggota superfamili dari *Transforming Growth Factor β* (TGF β) yang ditemukan pertama kali pada awal tahun 1990. GDF-9 terdiri dari 454 asam amino dan mempunyai berat molekul 51.444 Da (51 kDa) (Vitt *et al.*, 2002).

Penelitian ini menggunakan imunisasi pada kelinci dengan menggunakan antigen GDF-9 yang telah diisolasi dari oosit sapi yang dilakukan purifikasi terlebih dahulu, bertujuan untuk mendapatkan antibodi primer, penyuntikan antigen GDF-9 dilakukan dengan menambahkan CFA dan IFA sebagai adjuvant. Protein yang diimunisasikan dilakukan penambahan CFA untuk merangsang pembentukan antibodi terhadap GDF-9, sedangkan penambahan IFA pada booster berfungsi untuk meningkatkan kadar antibodi terhadap GDF-9 yang telah terbentuk.

Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antigen dapat dikenali oleh anti bodinya dengan di tandai terjadinya reaksi dengan antibodi sekunder (Anti Rabbit IgG alkanin phospatase) dan substrat *western blue*. Pada gambar 4.1 terlihat munculnya warna dot pada membran nitosellulosa yang diartikan sebagai tanda positif berdasarkan tingkat kegelapan warna dot. Warna tersebut sudah membuktikan bahwa terdapat protein yang sama pada antigen dan antibodi yaitu GDF-9.

Pada pengambilan darah pre-imun tidak muncul warna dot pada membran nitroselulosa, hasil ini menunjukkan bahwa pada kelinci yang belum diimunisasi tersebut tidak terdapat antibodi terhadap GDF-9.

Pengambilan darah pertama setelah booster pertama, sudah terdapat warna dot pada membran meskipun tidak terlalu gelap menunjukkan bahwa terdapat respon imun dan antibodi terhadap GDF-9 meskipun dalam jumlah yang kecil. Pengambilan darah kedua kadar antibodi pada darah meningkat, hal ini ditunjukkan pada warna dot yang lebih gelap dari pengambilan pertama. Respon imun terus meningkat hingga kadar antibodi GDF-9 tertinggi pada minggu keempat dan kemudian menurun lagi pada pengambilan darah kelima.

Pada hari kedua setelah pengambilan darah kelima dilakukan booster kedua yang diharapkan untuk meningkatkan kembali kadar antibodi yang telah menurun dan peningkatan antibodi terhadap GDF-9 yang lebih cepat dari booster pertama.

Pengambilan darah keenam belum terjadi peningkatan kadar antibodi. Pengambilan darah ketujuh menunjukkan peningkatan yang lebih cepat daripada pengambilan darah kedua, peningkatan ini akibat pemaparan antigen pada booster kedua, hasil ini dapat dilihat dari tabel skoring hasil dot blot.

Keseluruhan hasil dot blot tersebut dapat membuktikan bahwa penyuntikan atau imunisasi berulang GDF-9 dengan penambahan IFA dan CFA sebagai adjuvant pada booster dapat menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal GDF-9 pada kelinci jantan. Imunisasi berulang juga terbukti dapat

meningkatkan kecepatan pembentukan antibodi, terlihat pada peningkatan gradasi warna dan perbedaan skor hasil pembacaan dot pada membran nitroselulos. Terdapat perbedaan skor peningkatan antara pengambilan darah pertama, kedua dan ketiga dengan pengambilan darah keenam, ketujuh dan kedelapan. Perbedaan skor meningkat satu poin lebih tinggi, menunjukkan bahwa kadar antibodi terhadap GDF-9 meningkat lebih cepat. Kadar tertinggi antibodi terhadap GDF-9 ditunjukkan pada pengambilan darah keempat dan kesembilan.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat respon imun pada kelinci yang telah diimunisasi dengan antigen protein GDF-9 yang terbukti menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal pada kelinci jantan (*Oryctolagus cuniculus*), ini ditunjukkan pada nilai skoring pada hasil dari uji spesifitas GDF-9 menggunakan metode dot blot dan hasil skoring tertinggi didapat pada pengambilan darah keempat dan kesembilan.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendukung uji spesifitas menggunakan antibodi monoklonal dengan metode western blot.

RINGKASAN

Muhammad Teguh Setiawan. Uji Spesifitas Protein GDF-9 (*Growth Differentiation Factor-9*) pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel antral dengan metode Dot Blot. Dibimbing oleh DR. Widjiati, M.Si., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Moh. Sukmanadi, M. Kes., Drh. sebagai pembimbing kedua.

Growth Differentiation Factor 9 (GDF-9) merupakan protein growth factor yang ditemukan pertama kali pada awal tahun 1990 sebagai anggota *Transforming Growth Factor β* (TGF- β). *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) ini terdiri dari 454 asam amino dan mempunyai berat molekul 51 kDa (Vitt *et al.*, 2002). GDF-9 ditemukan pada ovarium rodensia, sapi dan kambing dan juga pada manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh data spesifitas *Growth Differentiation Factor 9* (GDF-9) pada oosit sapi yang dikoleksi dari folikel antral secara *in vitro* berdasarkan tingkat kegelapan warna yang terbentuk pada membrane nitrosellulose dengan metode Dot Blot.

Sebanyak empat ekor kelinci lokal jantan (*Oryctolagus cuniculus*) berumur yang berumur sekitar 8 bulan, berat badan 3-4 kg dengan GDF-9 ditambahkan CFA (*Complete Freund Adjuvant*) sebagai adjuvant. Penyuntikan dilakukan secara sub kutan dan imunisasi awal dilakukan pada dua hari setelah minggu pertama, kemudian pada minggu kedua dilakukan imunisasi ulang (Booster 1) dengan ditambahkan IFA (*Incomplete Freund Adjuvant*) dan dua hari setelah

minggu ketujuh. Pengambilan darah dilakukan sebanyak sepuluh kali mulai minggu ketiga sampai minggu ke-12

Sampel serum darah yang telah didapat dilakukan isolasi protein kemudian uji purifikasi dengan menggunakan elektroelusi. Pengujian spesifitas antibodi dilakukan dengan menggunakan metode *Dot Blot* kemudian hasil yang terbentuk pada membran nitroselulosa dibuat skoring berdasarkan tingkat kegelapan warna dot.

Hasil Penelitian ini menunjukkan bahwa imunisasi isolat GDF-9 dengan penambahan adjuvant dapat menginduksi terbentuknya antibodi terhadap GDF-9 (Anti GDF-9) pada kelinci lokal jantan (*Oryctolagus cuniculus*). Nilai skoring tertinggi terdapat pada pengambilan darah minggu keempat dan kesembilan.

DAFTAR PUSTAKA

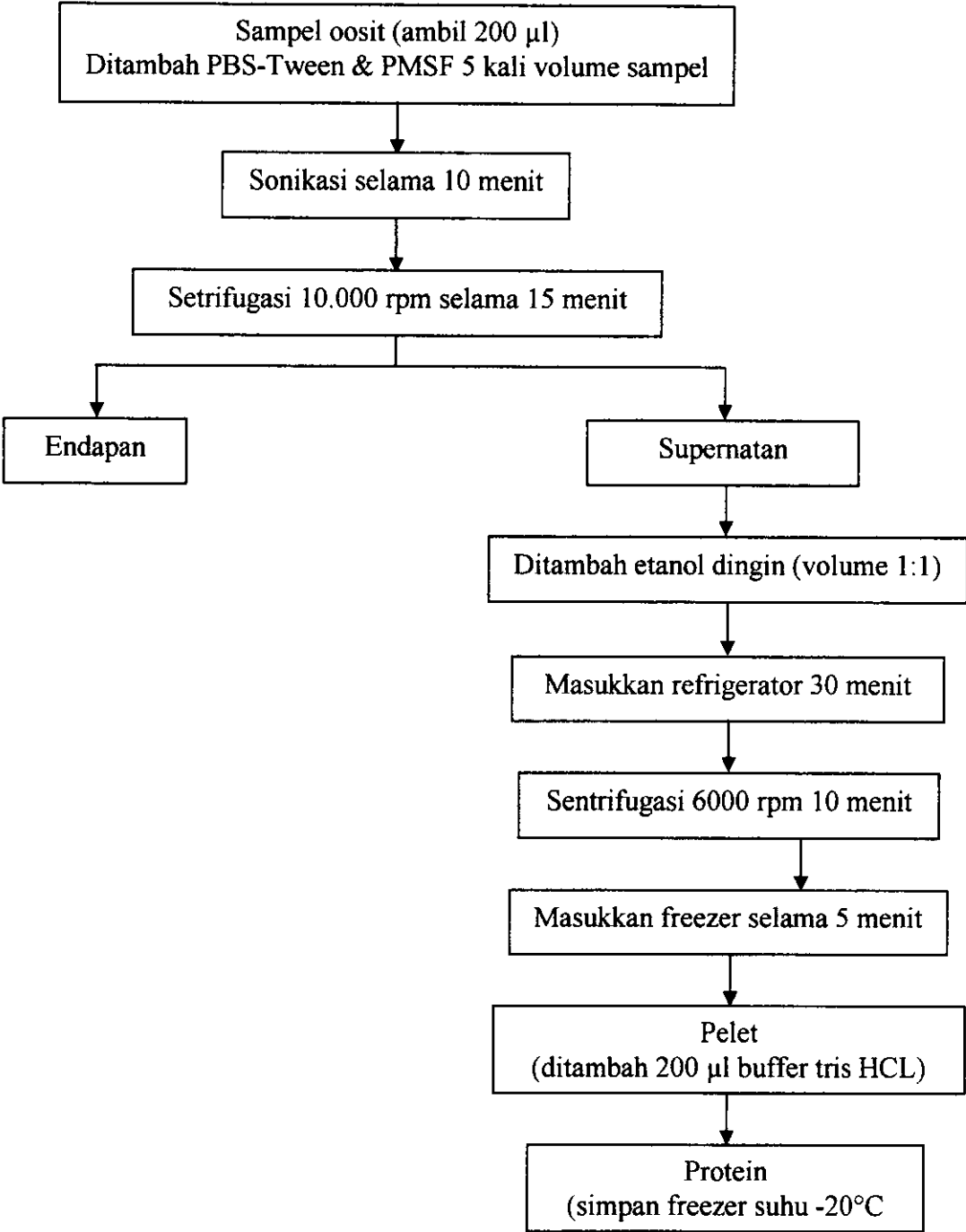
DAFTAR PUSTAKA

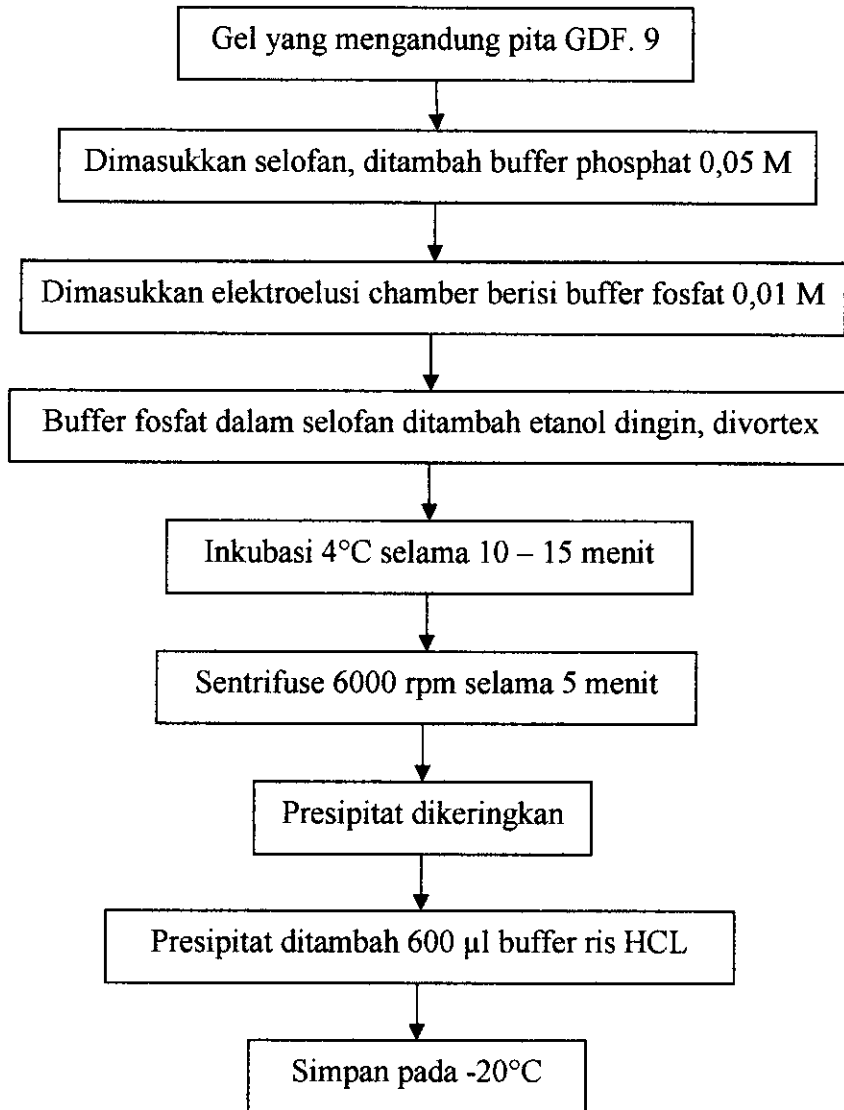
- Aaltonen. J , M. P. Laitinen., K. Vuojolainen , R. Jaatinen., N. H. Kuitunen., L. Seppa , H. Louhio., T. Tuuri., J. Sjoberg., R. Butzow., O. Hovata., L. Dale., and O. Ritvos. 1999. Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J. Endo. Met.* 84 : 2744-2750.
- Aulanni'am. 2004. Prinsip dan teknik analisis biomolekul. Edisi I. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Malang. Hal : 46-80.
- Bodensteiner, K. J., C. M. Clay, C. L. Moller and H.R. Sawyer 1999. Molecular cloning of bovine growth differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor in ovine ovaries. *J. Biol Reprod.* 60 : 381-386.
- Dellman, H. D. dan E. M. Brown. 1992. Buku Teks Histologi Veteriner. Penerbit Universitas Indonesia. UI Press. Jakarta. Hal : 486-500.
- Elvin, J. A., Y. Changning and M. M. Matzuki. 2000. Growth Differentiation Factor-9 (GDF-9) stimulates progesterone aynthesis in granulose cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. 97(18) : 10288.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomi dan Fisiologi Ternak. Edisi IV. Terjemahan B. Srigondo dan K. Prasno. Gajah Mada University Press, Yogyakarta : 683.
- Glitser, C. 2003. Oocyte Mediated Suppression of follicle-Stimulating Hormone 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- α . *J. Biol. Reprod.* 68 : 758-765.
- Goers J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manyal. Academic Press. Harcourt Brace Joanovich, Publisher, London.
- Hafez, E. S. E. 2000. Reproduction in Farm Animal 7th Edition. Lappincott William and Wilkin. Philadelphia. 48-52.
- Hayashi. M., E. A. McGee., G. Min., C. Klein., U. M. Rose., M. Van Duin., and A. J. Hsueh. 1999. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth differentiation of cultured early ovarian follicles. *J. Endo.* 140 : 1236-1244.

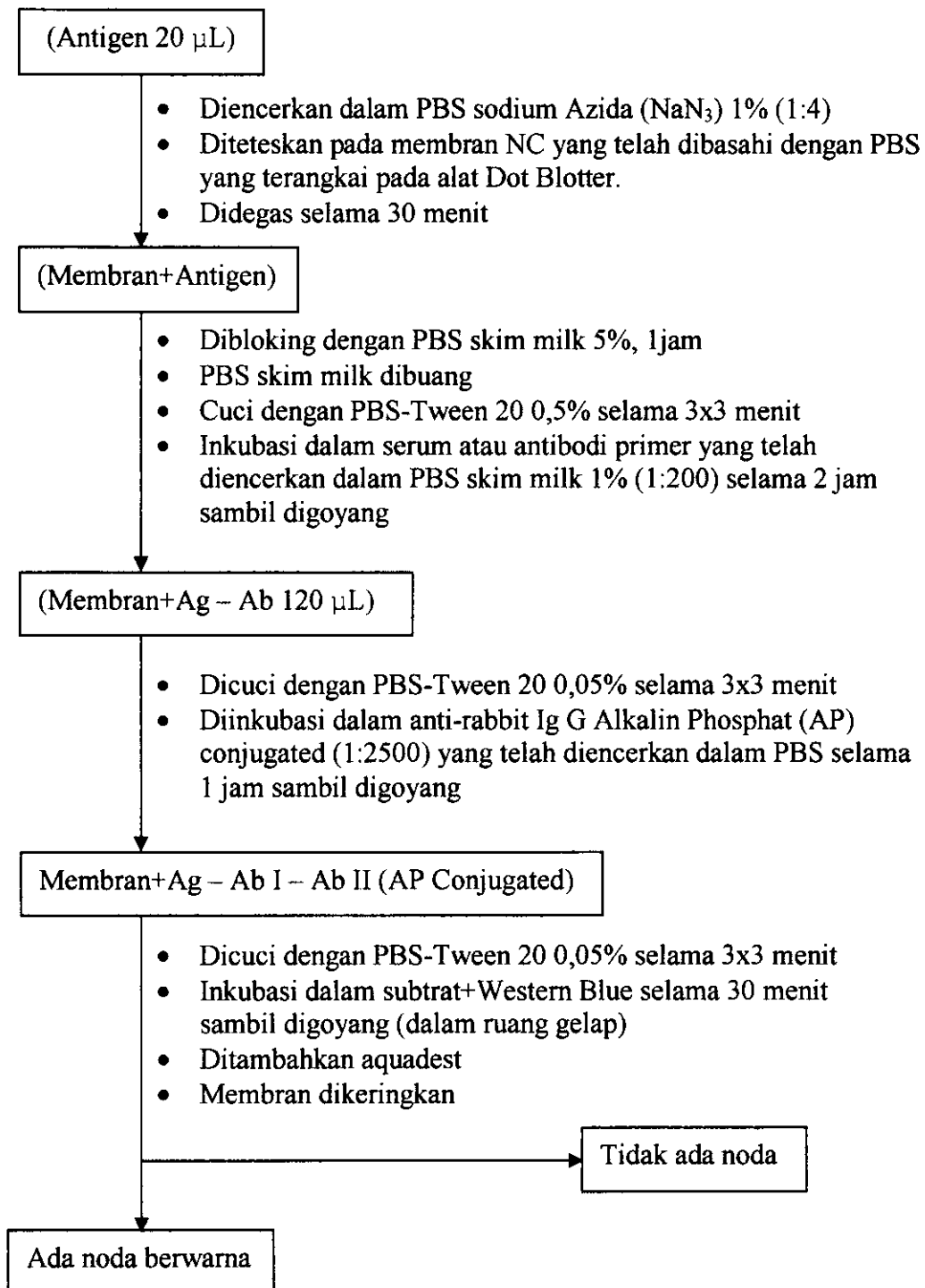
- Ismudiono, 1999. Fisiologi dan Reproduksi pada Ternak. Edisi II. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jayawardhana, B. C., S. Takashi, N. Hiromi, K. Etsushi. T. Masafumi and M. Akio. 2006. Hormonal regulation of expression growth differentiation factor-9 (GDF-9) receptor type I and II genes in vitro the bovine ovarian follicle. *J. Repro.* 131 (3) : 545.
- Mayes, M. 2002. The Meiotic Arrest of Bovine Oocyte. Thesis. Faculte Des Sciences De L'Agriculture et De L' Alimentation Universite Laval. Cuebec.
- Mazerbuorg, S., C. Klein, A. J. Hsueh, N. Kaivo-ojo. O. Ritvos, D. G. Motterhead and O. Korchynski. 2003. growth differentiation factor-9 (GDF-9) signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *J. Endo.* 18 : 653-665.
- Nilsson EE, Parrot JA, Skinner MK. 2002. Growth Differentiation Factor-9 Stimulates Progression of Early Primary but Not Primordial Rat Ovarian Follicle Development. *J. Biol. Reprod.* 69 (2) : 725.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ketiga. Penerbit Mutiara Sumber Daya.
- Pawshe, C . H., A. Palanisamy, S. K. Taniju, S. M. Jain and S. M Totey. 1996. Comparison of various maturation treatment on in vitro maturation of good oocytes and their early embriyonic development and cell number. *J. Theriogenology.* 46 : 971 982.
- Thomas, F.H. D. G. Armstrong, E. E. Telfer. 2003. Activin Promotes oocyte development in vitro bovine preantral follicles in vitro. *J. Reprod. Endoc.* 1 : 76.
- Vitt, U. A., S. Mazerbourg, C. Klein and A. J. Hsueh. 2002. Bone morphogenetic protein receptor for growth differentiation factor-9 (GDF-9). *Biology of Reproduction.* 67 : 473-480.
- Widjiati. 2007. Induksi maturasi oosit secara in vitro oleh TGF- β asal oosit cumulus kompleks. (Disertasi). Universitas Brawijaya. Malang.
- Yang P. And S.K. Roy. 2001. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles in vitro. *J. Biol. Reprod.* 65: 847-854.
- Yatim, W., 1994. Reproduksi dan Embriologi. Tarsito. Bandung. 65-70.

L A M P I R A N

Lampiran 1 : Isolasi Protein



Lampiran 2 : Elektroelusi

Lampiran 3 : Metode Dot Blotting

Lampiran 4 : Alat-alat Penelitian



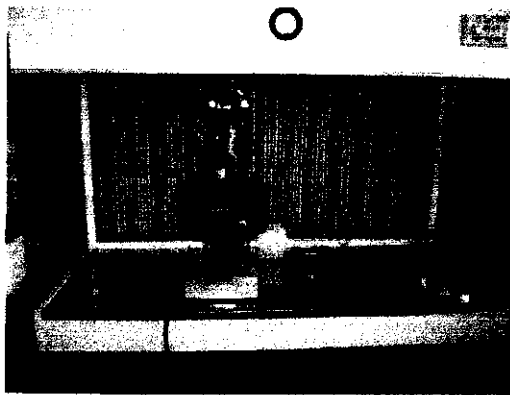
Pencucian Blotter



Alat Dot Blotter



Aspirasi Folikel



Laminar flow dan Mikroskop Inverted merk Meiji