

Karakterisasi Biokimiawi Protein Inhibin dari Sel Granulosa Folikel Ovarium Kambing

(Biochemistry Characterization of Inhibin from Goat Granulosa Cells)

T.N. Siregar¹⁾, Aulanni'am²⁾, T. Susilawati³⁾, G. Riady¹⁾, Hamdan¹⁾, dan T. Armansyah⁴⁾

¹⁾Jurusan Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda, Aceh

²⁾Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya, Malang

³⁾Jurusan Reproduksi Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

⁴⁾Jurusan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda, Aceh

Abstract

The objective this research is to study the isolation and characterization of inhibin from goat granulosa cells. Sample of ovary collected from abbatoir of Sukun in Malang. Minimum diameter of follicle that can be used in this research is 3 mm. Granulosa cells Oocytes collection was done by aspiration method, and granulosa cells separate from oosit mechanically. Biochemistry characterization of inhibin was done by technique of SDS PAGE, biuret and PAS. The result of research confirmed that inhibin has molecular 32 kDa. Composition of protein, carbohydrate, and glikoprotein inhibin was $3.636 \pm 0,002$; $2.569 \pm 0,002$; and 6.205 ± 0.016 mg/mL, respectively.

Key Words : Inhibin, granulosa cells, oocytes, follicle

Pendahuluan

Inhibin adalah protein dimer yang terdiri dari 2 subunit yakni subunit α dan subunit β . Subunit β terbagi 2 yakni βA (inhibin A) dan βB (inhibin B). Inhibin A dan B beraksi terhadap pituitari anterior dengan menekan biosintesis dan pelepasan FSH. Dimerisasi rantai β inhibin akan membentuk hormon gonad lain yakni activin. Activin A adalah dimer dari $\beta A-\beta A$ dan activin AB adalah dimer $\beta A-\beta B$. Activin mempunyai kebalikan fungsi dengan inhibin yakni menstimulasi sintesis dan sekresi FSH dari pituitari anterior (Woodruff dan Mayo, 1990).

Inhibin disintesis oleh 2 prekursor yang dihubungkan dengan jembatan disulfida. Prekursor terbesar dengan berat molekul berkisar 105 kDa mengalami pembelahan oleh enzim proteolitik untuk membentuk molekul terkecil (29-32 kDa) melalui bentuk molekul yang lebih kecil yakni 55, 65, dan 95 kDa (Kaneko *et al.*, 2003). Subunit α mempunyai berat molekul 18 kDa dan subunit β mempunyai berat molekul 14

kDa yang menghasilkan bentuk dimer $\alpha-\beta$ dengan berat molekul 32 kDa pada banyak spesies (Woodruff dan Mayo, 1990).

Inhibin adalah anggota superfamili TGF- β yang mempunyai kira-kira 35% sekuens homolog pada bagian carboxyterminal dan didasarkan pada pola residu sistein pada subunit α dan β (Ibelgaufits, 2003). Inhibin terutama dihasilkan oleh sel granulosa ovarium pada hewan betina dan sel sertoli testes pada hewan jantan dan terlibat dalam *feedback negative* sekresi FSH (Woodruff dan Mayo, 1990). Secara umum diketahui 2 hormon yang berperan dalam menghambat sekresi FSH yakni inhibin dan estrogen (Findlay *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1995). Tetapi, pada tahun terakhir telah dibuktikan bahwa inhibitor utama sekresi FSH adalah inhibin. Peran estrogen hanya sebagai signal maturasi dan penentu waktu ovulasi (Taya *et al.*, 1996).

Berat molekul glikoprotein inhibin pada beberapa spesies bervariasi. Ireland *et al.* (1994) mengkarakterisasi glikoprotein inhibin yang berasal dari cairan folikel sapi dengan berat

molekul berkisar antara 29-160 kDa. Pada babi, Guthrie dan Garrett (2000) mengkarakterisasi glikoprotein inhibin dengan berat molekul 69-227 kDa. Selanjutnya Goudet *et al.* (1997) mengkarakterisasi glikoprotein inhibin pada cairan folikel kuda dengan berat molekul 18 kDa dan inhibin dari sel granulosa dengan berat molekul 50 kDa. Variasi ini kemungkinan disebabkan oleh enzim proteolitik sehingga diperoleh bentuk-bentuk molekul inhibin yang berbeda. (Myamoto *et al.*, 1986). Meskipun terdapat variasi berat molekul inhibin namun Woodruff dan Mayo (1990) menegaskan bahwa inhibin dengan berat molekul 32 kDa merupakan bentuk matang inhibin.

Untuk tujuan pengembangan protein inhibin sel granulosa folikel ovarium kambing menjadi kandidat vaksin untuk induksi *multiple ovulation* maka perlu dilakukan karakterisasi terhadap inhibin tersebut yang dapat bermanfaat untuk isolasi protein guna uji imunogenisitas maupun produksinya. Protein adalah antigen yang dapat menginduksi terbentuknya antibodi. Timbulnya antibodi dapat digunakan sebagai petunjuk bahwa protein yang dimaksud mempunyai sifat imunogenik. Apabila berat molekul inhibin sel granulosa folikel ovarium kambing 32 kDa, seperti pada spesies lainnya maka protein inhibin tersebut dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Subowo (1993) mengatakan protein dengan berat molekul >10.000 Dalton merupakan imunogen yang kuat.

Metode Penelitian

Koleksi Oosit

Ovarium kambing yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Sukun, Malang, dicuci dengan NaCl fisiologis yang ditambahkan antibiotik penicillin 0,06 gram/liter dan streptomisin 0,10 gram/liter. Selanjutnya, ovarium disimpan dalam

freezer -20°C sampai jumlahnya mencukupi (masing-masing \pm 20 pasang). Ovarium dicairkan dalam NaCl fisiologis 0,90% dan dilakukan prosedur aspirasi dengan spuit 3 ml jarum 18,00 G. Koleksi oosit dilakukan menggunakan mikroskop stereo dengan pencucian 3 kali dengan PBS pH 4,70. Folikel yang digunakan untuk aspirasi berukuran >3 mm.

Preparasi Sel Granulosa

Preparasi sel granulosa dilakukan mengikuti petunjuk Goudet *et al.* (1997) yang dimodifikasi. Oosit yang diperoleh dari hasil aspirasi diperlakukan secara mekanik dengan pipet pasteur yang dimodifikasi untuk memperoleh sel granulosa. Sel granulosa kemudian dicuci 2 kali dengan PBS, kemudian dicuci 1 kali dengan PBS+PMSF. Sel granulosa kemudian divortex 10 menit dan diikuti dengan sonikasi selama 10 menit. Selanjutnya disentrifugasi 3000 rpm selama 30 menit. Sebanyak 600 μ L supernatan ditambah dengan 600 μ L, sedang presipitatnya dibuang. Campuran supernatan disimpan dalam refrigerator semalam, kemudian disentrifus 3000 rpm selama 30 menit untuk memperoleh endapan. Endapan yang terbentuk merupakan protein dari sel granulosa. Endapan tersebut kemudian ditambah dengan satu volume buffer hipotonik (KCl 10 mM, Tris 10 mM, EDTA 0,5 mM) berisi PMSF (Sigma), TLCK (Sigma), dan TPCK (Sigma) dan disimpan pada suhu -20°C.

Penentuan Berat Molekul

Persiapan gel. Plat gel dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat \pm 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfate* (APS) dan *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamina*

(TMEDA) , kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TMEDA ditambahkan dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras. *Stacking gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel, dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi Sampel. Sampel yang berisi 12,50 µl sampel sel granulosa dan 12,50 µl *running sampel buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 µl untuk tiap sumur. Untuk protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan ke listrik dengan arus sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda ± 0,50 cm dari batas bawah *plate* gel.

Perlakuan Setelah *Running*. Gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 ml asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan massa molekul relatif (*Mr*) protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul glikoprotein, dilakukan dengan menghitung *Rf* (*Retardation factor*) dari masing-masing pita sesuai menurut Sumitro (1996) menggunakan rumus :

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

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relatif sampel. Nilai *Rf* dan berat molekul protein standar terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai protein standar produksi BioRad

Rf (Sb X)	BM (kDa)	Log BM (Sb Y)
0,064	200	5,3010
0,177	116,25	5,0654
0,223	97,40	4,9885
0,371	66,20	4,8208
0,564	45	4,6532
0,887	31	4,4912

Pengukuran Kandungan Protein dengan Metode Biuret

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum BSA 5000 ppm

Sebanyak 200 µL larutan standar *bovine serum albumine* (BSA) konsentrasi 5000 ppm dimasukkan ke dalam eppendorf, ditambah dengan 800 µL reagen Biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada kisaran panjang gelombang 500-600 nm. Sebagai blanko, dipipet 200 µl akuades dan 800 µL reagen Biuret.

Pembuatan Kurva Standar BSA

Disiapkan 10 eppendorf, masing-masing ditambah dengan 200 µl larutan standar BSA (*bovine serum albumin*) dengan variasi konsentrasi 1000-10000 ppm. Masing-masing ditambah dengan 800 µL reagen Biuret. Kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Kemudian dibuat persamaan regresi linear hubungan antara

konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh kurva standar BSA.

Pengukuran Kandungan Protein Inhibin

Diambil 200 µl sampel inhibin. ditambah 800 µl reagen Biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum yang diperoleh dari pengukuran larutan standar BSA 5000 ppm. Sebagai blanko dipipet 200 µl air dan ditambah 800 µl reagen Biuret. dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali.

Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data dan absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linear kurva standar BSA, menurut Hamilton, (1992) menggunakan rumus :

$$Y = a X$$

$$X = \frac{Y}{a}$$

X = konsentrasi total protein

Pengukuran Kandungan Glikoprotein dan Karbohidrat

Pengukuran Absorbansi Protein Standar

Blanko dipipet sebanyak 200 µl *glikoprotein assay buffer*, ditambah dengan 200 µl larutan KIO₄ 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600 µl *Glikoprotein Detection Reagen* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan *shaker* kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 550 nm.

Protein Standar. Disiapkan 6 buah eppendorf untuk 6 protein standar (lysozyme, bovine serum albumin, ovalbumin, apo-transferrin, fetuin, dan α₁- acid glycoprotein). Selanjutnya dipipet sebanyak 200 µl masing-masing protein standar,

ditambah dengan 200 µl larutan KIO₄ 10 mM, dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 detik. Kemudian ditambah dengan 600 µl *glycoprotein detection reagen* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang sambil digoyang menggunakan *shaker*. Selanjutnya diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ 550 nm.

Menurut *glycoprotein carbohydrate estimation kit* 23260, nilai untuk protein standar dan kandungan karbohidrat total yang telah diketahui dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada penelitian ini digunakan jenis protein yang sama dengan *Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit* sehingga konsentrasi protein (mg/ml) dan konsentrasi karbohidrat total (% v/v) sama.

Pengukuran Kandungan Glikoprotein dan Karbohidrat Inhibin

Disiapkan 2 eppendorf, 1 eppendorf diisi 200 µl *glikoprotein assay buffer* sebagai blanko dan 1 eppendorf diisi 10 µL sampel isolat inhibin diencerkan sampai volume 200 µl dengan pelarut *glikoprotein assay buffer*. Kemudian masing-masing eppendorf ditambahkan 200 µl kalium periodat 10 mM, dihomogenkan dengan vortex, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya masing-masing eppendorf ditambahkan 600 µl *glycoprotein detection reagent*, dihomogenkan dengan vortex diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada λ maksimum 550 nm dan diulangi 3 kali.

Kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel diperoleh dengan membandingkan larutan standar proteinnya menggunakan rumus (Anonymous, 1998) :

$$\text{Glikoprotein (mg/ml)} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times \text{pengenceran}$$

Tabel 2. Nilai protein standart dan kandungan karbohidrat total berdasarkan glikoprotein karbohidrat estimation Kit 23260

Protein	Konsentrasi Protein (mg/ml)	Karbohidrat Total (%)
Blanko	0	0
Lysozyme	2,50	0
Bovine Serum Albumin	2,50	Sedikit
Ovalbumin	2,50	3.20
Apo-Transferin	2,50	5.80
Fetuin	0,25	22.90
Fetuin	2,50	22.90
α_1 - Acid Glycoprotein	0,25	41.40
α_1 - Acid Glycoprotein	2,50	41.40

Karbohidrat (mg/ml) = Kandungan glikoprotein x % total karbohidrat standar

Analisis Data

Data disajikan dalam bentuk tabel dan gambar yang dibahas secara deskriptif.

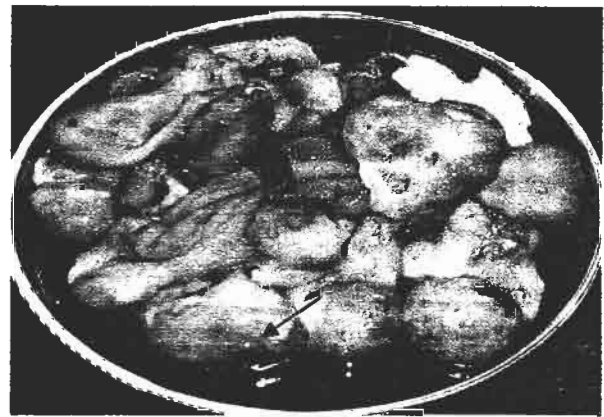
Hasil dan Pembahasan

Preparasi Sel Granulosa

Ovarium kambing yang didapatkan dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Sukun-Malang dimasukkan ke dalam gelas piala kemudian ditambah dengan NaCl fisiologis 0,90 % yang mengandung antibiotik penisilin dan streptomisin sebanyak 100 mL. Folikel yang digunakan pada penelitian ini adalah folikel permukaan ovarium yang diduga berada pada fase folikel sekunder dengan diameter ≥ 3 mm. Gambar 1 memperlihatkan bentuk ovarium kambing dengan folikel sekunder.

Selanjutnya dilakukan aspirasi pada folikel ovarium kambing menggunakan spuit 3 mL jarum 22,5 G yang diisi dengan sedikit larutan *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7,4. Cairan folikel yang diperoleh dari aspirasi ditempatkan dalam tabung reaksi kecil dan dibiarkan dalam waktu ± 20 menit, sehingga akan terpisah antara supernatan

dan endapannya, dan sel-sel granulosa terdapat dalam endapan.

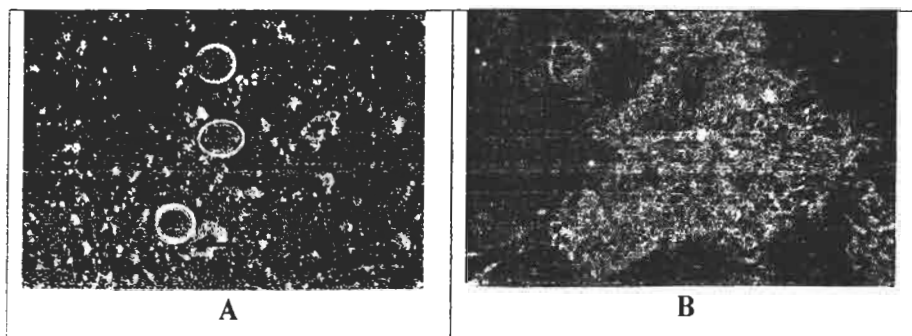


Gambar 1. Ovarium kambing (→ folikel permukaan)

Langkah selanjutnya adalah mengambil sel granulosa dengan menggunakan pipet pasteur yang dimodifikasi agar sel-sel granulosa dapat diambil. Perlakuan ini dilakukan di bawah mikroskop monokuler dengan perbesaran 400 kali sehingga didapatkan sel-sel granulosa. Hasil isolasi sel-sel granulosa ditampilkan pada Gambar 2.

Kandungan Protein, Glikoprotein dan Karbohidrat Inhibin

Kandungan protein inhibin ditentukan dengan mengkonversikan serapan pada kurva *Bovine serum albumine* (BSA) yang sudah diketahui konsentrasinya. Hasil penelitian dan analisis pada



Gambar 2. Hasil isolasi sel granulosa

- A. Sel granulosa dengan oosit yang telah terpisah
 B. Sel granulosa tanpa oosit
 → Sel granulosa

Tabel 3. Karakter biokimiawi inhibin sel granulosa folikel ovarium kambing

Rataan Kandungan dalam Inhibin	Inhibin	Metode
Glikoprotein (mg/ml)	6,205±0,016	Metode PAS
Karbohidrat (mg/ml)	2,569±0,018	Metode PAS
Protein (mg/ml)	3,636±0,002	Metode Biuret
BM Relatif (kDa)	32,0	SDS-PAGE

persamaan $Y = 5 \times 10^{-5} X$, diperoleh kandungan rata-rata protein total isolat inhibin sebesar $3633,3 \pm 11,55 \mu\text{g/ml}$.

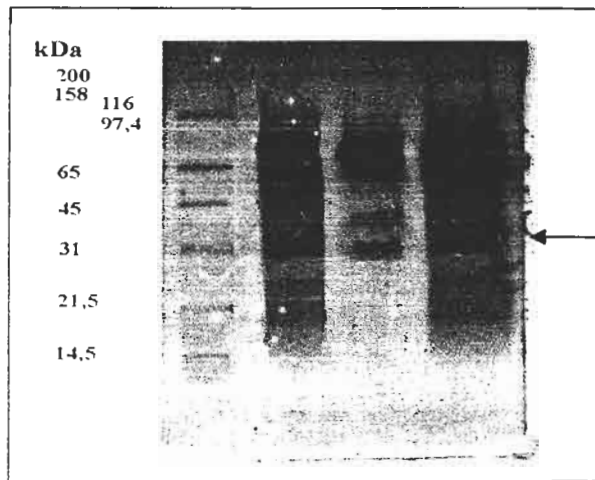
Berdasarkan hasil yang telah diperoleh menunjukkan bahwa isolat inhibin dapat digunakan sebagai imunogen. Syarat minimal penggunaan protein sebagai antigen adalah sebesar $300 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ pelarut. Tinggi rendahnya protein yang terkandung dalam inhibin tergantung pada oosit dari ovarium hewan. Kandungan protein setiap hewan berbeda karena tiap hewan mempunyai sintesis asam amino yang berbeda.

Hasil penelitian dan perhitungan diperoleh kandungan rata-rata glikoprotein isolat inhibin sebesar $6,205 \pm 0,016 \text{ mg/ml}$. Berdasarkan hasil tersebut, dapat ditentukan kandungan karbohidrat dan protein rata-rata sebesar $2,569 \pm 0,018 \text{ mg/ml}$ dan $3,636 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ (Tabel 3).

Berat Molekul Inhibin

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dengan pewarnaan glikoprotein *staining kit* dari Pierce Co (24562) membuktikan bahwa glikoprotein inhibin dapat diisolasi dari sel granulosa seperti yang terlihat pada Gambar 3. Pada Gambar 3 tersebut menunjukkan adanya pita molekul protein dengan berat molekul (BM) 32 kDa yang diyakini sebagai molekul inhibin.

Berat molekul glikoprotein inhibin di antara spesies mamalia sangat bervariasi. Pada sapi, Ireland *et al.* (1994) menemukan 8 bentuk berat molekul inhibin yakni 29, 34, 48, 58, 68, 77, 122, dan >160 kDa. Selanjutnya Guthrie dan Garrett (2000) menemukan 4 bentuk berat molekul pada babi, yakni 69, 121, 227, dan >227 kDa. Variasi inhibin ini kemungkinan berhubungan dengan status folikel yang digunakan sebagai sumber



Gambar 3. Elektroforegram inhibin
M = Marker, → BM Inhibin = 32 kDa

inhibin pada stadium reproduksi dan sumber inhibin yang akan diisolasi.

Perbedaan status perkembangan folikel pada stadium reproduksi berhubungan dengan bentuk dan proporsi berat molekul inhibin yang diperoleh. Pada sapi, folikel dominan yang mengalami atresi pada fase luteal, proporsi inhibin dengan berat molekul 110 dan >160 kDa rendah, sedangkan inhibin dengan berat molekul 32 kDa mengalami proporsi yang tinggi. Pada folikel dominan pada fase folikuler, proporsi inhibin dengan berat molekul 29 kDa rendah, tetapi proporsi inhibin dengan berat molekul >110 kDa tinggi (Sunderland *et al.*, 2005). Sumber inhibin yang diperoleh kemungkinan juga mempengaruhi bentuk molekul inhibin. Goudet *et al.* (1997) menemukan inhibin dengan berat molekul 50 kDa pada sel granulosa dan inhibin dengan berat molekul 18 kDa pada cairan folikel kuda.

Meskipun terdapat beberapa bentuk molekul inhibin, tetapi Woodruff dan Mayo (1990) menegaskan bahwa bentuk matang molekul inhibin adalah 32 kDa yang terdiri dari suatu rantai α (18 kDa) dan suatu rantai β (14 kDa) yang dihubungkan oleh jembatan sulfida. Bentuk inhibin matang berasal dari proses proteolitik molekul inhibin yang lebih besar. Myamoto *et al.* (1986) menemukan 6 bentuk molekul inhibin dari

cairan folikel sapi yakni 120, 108, 88, 65, 55, dan 32 kDa. Variasi ini disebabkan oleh enzim proteolitik sehingga diperoleh bentuk-bentuk molekul inhibin yang berbeda. Inhibin dengan berat molekul 65, 55, dan 32 kDa terdiri dari 2 subunit polipeptida yang dihubungkan oleh jembatan disulfida. Pada ketiga bentuk tersebut, subunit 13 kDa merupakan subunit terkecil yang berhubungan dengan polipeptida 57, 44, dan 20 kDa. Inhibin dengan berat molekul 120, 108, dan 88 kDa terdiri dari 3 subunit polipeptida. Pada bentuk ini, suatu polipeptida 62 kDa berhubungan dengan subunit terkecil pada 32 kDa dan dihubungkan dengan jembatan disulfida sebagai komponen ketiga pada masing-masing bentuk molekul inhibin yang lebih kecil.

Hasil SDS-PAGE (Gambar 3) sel-sel granulosa memperlihatkan beberapa pita protein. Pada penelitian ini hanya pita protein yang mempunyai berat molekul 32 kDa yang dijadikan isolat inhibin. Pertimbangan ini didasarkan pada banyaknya variasi berat molekul inhibin yang kemungkinan tergantung pada spesies hewan. Secara umum, semua mamalia mempunyai molekul inhibin yang matang dengan berat molekul 32 kDa. Konfirmasi uji spesifisitas dengan teknik *western blot* diketahui bahwa anti-inhibin mengenali suatu protein inhibin dengan berat molekul 32 kDa (Siregar *et al.*, 2005).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa Berat molekul inhibin sel granulosa folikel ovarium kambing adalah sebesar 32 kDa. Kandungan protein total inhibin rata-rata sebesar $3633,3 \pm 11,55 \mu\text{g/mL}$. Kandungan glikoprotein inhibin rata-rata sebesar $6,205 \pm 0,016 \text{ mg/ml}$. Berdasarkan kandungan glikoprotein dapat diperoleh kandungan protein dan karbohidrat rata-rata sebesar $3,636 \pm 0,002 \text{ mg/ml}$ dan

2,569±0,002 mg/ml. Perlu dilaku-kan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui variasi bentuk molekuler inhibin pada kambing, sehingga dapat diuji bentuk molekuler yang memiliki potensi biologis paling baik dalam menginduksi anti-inhibin.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana melalui Dana Penelitian Hibah Bersaing XIII Tahun Anggaran 2005 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik. Selanjutnya terimakasih kepada Saudari Risti M dan Siti Imroatul Maslikah atas bantuan tenaga dan pikiran sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan lancar.

Daftar Pustaka

- Findlay, J.K., D.M. Robertson, I.J. Clarke, R. Klein, B.W. Doughton, S. Xiao, D.L. Russel, and L. Shukovski, 1992. Hormonal regulation of reproduction-general concepts. *Anim. Reprod. Sci.* 28:319-328.
- Goudet, G., F. Belin, J. Bezar, and N. Gerard, 1997. Intrafollicular content of LH receptor, α -inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol. Reprod.* 232-245.
- Guthrie, H.D., and W. Garrett, 2000. Physiology and expression of inhibin/activin transcripts and different molecular forms of inhibin protein during follicle in pigs. Agricultural Research Service (*Abstract*).
- Ibelgauf, H., 2003. *Inhibins*. Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. COPE Philippine Universities Library.
- Ireland, H.J.L., T.E. Good, P.G. Knight, and J.J. Ireland, 1994. Alterations in amounts different forms of inhibin during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50 : 1265:1276.
- Kaneko, H., H. Kishi, G. Watanabe, K. Taya, S. Sasamoto, and Y. Hasegawa, 1995. Changes in plasma concentration of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J. Reprod. Dev.* 42 : 311-320.
- Kaneko, H., J. Noguchi, K. Kikuchi, and Y. Hasegawa, 2003. Molecular weight forms of inhibin A and inhibin B in the bovine testis change with age. *Biol. Reprod.* 68 : 1918-1925.
- Myamoto, K., Y. Hasegawa, M. Fukuda, and M. Igarashi, 1986. Demonstration of high molecular weight forms of inhibin in bovine follicular fluid by using monoclonal antibodies to bFF 32 K inhibin. *Biochem Biophys Res Commun.* 136 (3) : 1103-1109.
- Siregar, T.N., Aulanni'am, T. Susilawati, and Y. Linggi, 2005. Characterization of antibody against inhibin in rabbit following induction of inhibin isolated from goat granulosa cells. Proceedings International Asia Link Symposium "Reproductive Biotechnology for Improved Animal Breeding in Southeast Asia" 19-20 August, 2005. Universitas of Udayana, Bukit Jimbaran, Denpasar, Bali: 211-212.
- Subowo, 1993. *Imunobiologi*. Angkasa, Bandung.
- Sumitro, B.S., S. Rahayu, Fatchiyah dan S.Widyarti, 1996, *Materi Kursus Teknik-teknik Dasar Analisa Protein dan DNA*. Jurusan Biologi, FMIPA, Unibraw, Malang, hal. 25-26.
- Sunderland, S.J., P.G. Knight, M.P. Boland, J.F. Roche, and J.J. Ireland, 2005. Alteration in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. <http://www.vetmed.ucd/index.htm>.
- Taya, K., H. Kaneko, T. Takedomi, H. Ishi, and G. Watanabe, 1996. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:563-570.
- Woodruff, T.K., and K.E. Mayo, 1990. Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. *Annu. Rev. Physiol.* 52:807-821.