

KARAKTERISASI PROTEIN INHIBIN DARI SEL GRANULOSA HASIL KULTUR DAN NON KULTUR SEBAGAI DASAR PRODUKSI ANTIBODI MONOKLONAL INHIBIN

*Characterization of Inhibin from Culture and Non Culture of Granulose Cells for
Monoclonal Antibody of Inhibin Production*

Amiruddin¹, Tongku Nizwan Siregar², Amalia Sutriana³, Dwinna Aliza⁴, dan
T. Armansyah³

¹Laboratorium Klinik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

³Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

⁴Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

E-mail: tongku_ns@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini mempunyai tujuan jangka panjang untuk memperoleh prototipe imunogen yang digunakan untuk induksi *multiple ovulation* pada kambing. Tahapan kerja pada penelitian ini dimulai dari koleksi ovarium kambing, koleksi sel granulosa, kultur dan karakterisasi protein inhibin meliputi berat molekul, titik isoelektrik (pI) yang berasal dari sel granulosa kambing hasil kultur dan non-kultur, selanjutnya dibuat monoklonal antibodi terhadap inhibin. Hasil penelitian menunjukkan inhibin hasil isolasi inhibin baik dari hasil kultur granulosa ataupun sel granulosa non-kultur didapatkan pita dengan BM 32 kDa. Untuk mengetahui berat molekul inhibin hasil isolasi maka dikonfirmasi dengan metode *Western Blot*. Pita hasil SDS-PAGE dengan berat molekul 32 kDa yang tampak pada hasil *Western Blot* adalah molekul inhibin hasil isolasi dari sel granulosa hasil kultur dan non-kultur granulosa yang dikenali oleh Mab-inhibin. Hasil IEF gel elektroforesis menunjukkan bahwa molekul inhibin dari kultur granulosa tidak bermuatan pada titik isoelektrik 5-6, tergantung dari total kandungan asam amino penyusunnya.

Kata kunci: antibodi monoklonal inhibin, sel granulosa, kultur

ABSTRACT

This study has long-term objectives to obtain immunogenic prototype that can be used to induce multiple ovulation in goats. Working steps of this study were begun with the collection of ovarium from goats, collection of granulose cells, culture of granulose and characterization of molecular weight and isoelectric point (pI) of inhibin protein of granulose cells obtained from culture and non-culture of granulose cells, and followed by preparation of monoclonal antibody toward inhibin. The results showed that inhibin isolated either from culture or non-culture of granulose cells produced a 32 kDa band. Molecular weight of inhibin was measured by Western Blot. The 32 kDa band of SDS PAGE product appeared on Western Blot result was inhibin molecules produced by granulose cells collected fom culture and non-culture of granulose cells that can be identified by Mab-inhibin. Product of IEF gel electrophoresis suggested that inhibin molecule collected from culture of granulose cells has no charge at isoelectric points ranging from 5-6, depends on its total amino acid composition.

Keywords: monoclonal antibody inhibin, granulose cells, culture

PENDAHULUAN

Populasi ternak kambing di Indonesia sampai akhir tahun 2005 mencapai 13.182.064 ekor dengan angka pertumbuhan hanya sekitar 3,14%. Jumlah populasi ini mengalami kecenderungan menurun setiap tahunnya (Anonimus, 2006). Penurunan populasi ini kemungkinan disebabkan tidak seimbanginya perkembangan populasi dibanding permintaan hasil produksinya. Hasil survei di Pulau Jawa memperlihatkan bahwa jumlah petani yang

memelihara ternak kambing mencapai 30%. Dengan kenyataan tersebut ternak kambing memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai sumber produk asal ternak di Indonesia (Suyadi, 2003).

Salah satu upaya untuk meningkatkan potensi reproduksi kambing adalah melalui aplikasi teknologi inseminasi buatan dan transfer embrio. Keberhasilan kedua teknologi ini sangat tergantung pada jumlah sel telur yang diovulasikan setiap siklusnya. Terbatasnya jumlah ovulasi disebabkan supresi hormon

FSH oleh protein inhibin yang dihasilkan oleh sel granulosa (Kaneko *et al.*, 1993). Oleh karena itu imunisasi seekor ternak dengan vaksin inhibin akan dapat menetralkan inhibin yang bersirkulasi dan mencegah supresi FSH sehingga jumlah folikel yang tumbuh dan ovulasi akan bertambah (O'Shea *et al.*, 1994; Siregar *et al.*, 2006).

Secara fungsional, inhibin bertanggung jawab dalam proses pematangan dan perkembangan folikel serta regulasi sistem hormonal reproduksi dalam tubuh. Inhibin merupakan gonadal polipeptida yang disekresikan sebagai umpan balik negatif terhadap hipotalamus untuk mengurangi sekresi FSH dari kelenjar pituitari. Hal ini berakibat pada rangsangan terhadap folikel lain untuk matang dan berkembang. Peranan inhibin dalam penurunan konsentrasi FSH telah diketahui pada sapi (Ishigame *et al.*, 2005), kuda (Donadeu dan Ginther, 2001), kambing (Araki *et al.*, 2000) bahkan manusia (Robertson *et al.*, 2002). Hal ini memungkinkan untuk dilakukannya penghambatan sekresi inhibin oleh anti-inhibin sehingga meningkatkan sekresi FSH dan menginduksi terjadinya ovulasi (Ishigame *et al.*, 2004).

Follicle stimulating hormone (FSH) adalah hormon gonadotropin yang disekresikan oleh hipofisa anterior dan sekresinya distimulasi oleh GnRH dari hipotalamus serta dihambat oleh hormon ovarium seperti hormon steroid dan inhibin. Inhibin adalah regulator utama sekresi FSH oleh hipofisa anterior pada berbagai mamalia (Alvarez *et al.*, 1998; Taya *et al.*, 1996). Penggunaan inhibin dan anti-inhibin sebagai vaksin untuk induksi *multiple ovulation* masing-masing dilakukan secara imunisasi aktif dan pasif. Hasil isolasi inhibin dari sel granulosa folikel ovarium kambing diketahui bahwa inhibin mempunyai berat molekul 32 kDa (Siregar *et al.*, 2005a) dan mampu menginduksi terbentuknya anti-inhibin yang mempunyai reaksi silang dengan inhibin sapi dan domba (Siregar *et al.*, 2005b).

Imunogen yang digunakan sebagai prototipe untuk induksi kelahiran kembar dapat menggunakan antibodi terhadap inhibin baik natif maupun pasif. Angka keberhasilan induksi *multiple ovulation* antara protein dan natif inhibin menunjukkan hasil yang berbeda di antara spesies ternak (Hillard *et al.*, 1995). Penggunaan natif inhibin yang berasal dari sel granulosa kambing terbukti mampu meningkatkan jumlah ovulasi (Siregar *et al.*, 2006), tetapi belum diketahui respon

monoklonal antibodi inhibinnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu riset yang bertujuan menghasilkan protein imunogen berbasis antibodi monoklonal inhibin yang dapat dijadikan seleksi imunogen untuk menghasilkan prototipe vaksin untuk induksi kelahiran kembar dan *multiple ovulation* pada kambing.

MATERI DAN METODE

Untuk mencapai sasaran yang diinginkan, maka dilakukan langkah-langkah penelitian sebagai berikut, yakni menyiapkan sel granulosa kambing, melakukan kultur sel granulosa kambing, melakukan isolasi dan karakterisasi isolat inhibin baik dari koleksi sel granulosa maupun hasil kultur sel granulosa, serta melakukan konfirmasi titik isoelektrik (pI) dari isolat inhibin dan berat molekul (BM). Langkah-langkah kegiatan adalah penyiapan ovarium kambing, dilanjutkan kultur sel granulosa, isolasi inhibin dari sel granulosa hasil aspirasi dan hasil kultur melalui sentrifugasi, spektrofotometri, SDS-PAGE, dan penentuan titik isoelektrik (pI) dengan dua dimensi elektroforesis.

Preparasi Sel Granulosa

Ovarium kambing yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Sukun, Malang dibersihkan dari jaringan lemak dan dicuci dengan NaCl fisiologis yang ditambahkan antibiotik 0,06 g/l penisilin dan 0,1 g/l streptomisin. Ovarium yang diperoleh diaspirasi dengan menggunakan spuit 3 ml. Cairan folikel kemudian dibilas sebanyak 3 kali dengan larutan PBS. Cairan folikel diletakkan di cawan petri, kemudian dipisahkan antara sel granulosa dan oosit dengan menggunakan pipet *pasteur* di bawah mikroskop stereo binokuler. Sel granulosa yang diperoleh merupakan sampel non-kultur sedangkan sampel kultur diperoleh dari kultur sel granulosa yang dilaksanakan di Laboratorium *In Vitro Fertilization*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Kultur Sel Granulosa

Suspensi sel granulosa dipindahkan ke dalam tabung baru, dicuci dengan media TCM-199 yang mengandung gentamisin 0,01/100 ml dan thiomersal 0,03/100 ml sebanyak dua kali. Suspensi kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm pada suhu 20 °C selama 5 menit. Pelet hasil suspensi dilarutkan dalam media

TCM-199 yang ditambahkan BSA 3%, dimasukkan dalam *culture petri disk* dengan volume yang sama dan ditumbuhkan dalam inkubator suhu 37 °C, 5% CO₂ selama 3-5 hari. Sel-sel konfluen dipassage (pergantian media) ke *culture petri disk* dengan volume yang sama dan ditumbuhkan dalam inkubator suhu 37 °C, 5% CO₂ selama 3-5 hari.

Isolasi dan Purifikasi Protein

Sel granulosita ditambah dengan larutan PBS Tween-PMSF (Sigma, Cat No P-7626) sebanyak 5x volume sampel kemudian disonikasi selama 10 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit suhu 4 °C. Supernatan ditambahkan dengan etanol absolut dengan perbandingan 1:1, disimpan satu malam pada suhu 4 °C. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit suhu 4 °C. Pelet dikering-anginkan dan ditambah buffer 20 mM Tris-Cl (MP Biomedicals, Cat No 816116) pH 6,8. Sampel disimpan dalam freezer suhu -20 °C.

Elektroforesis

Elektroforesis SDS PAGE dilakukan menggunakan sistem *discontinuous* dengan *separating gel* 12,5% dan *stacking gel* 3%. Metode elektroforesis ini berdasarkan metode Laemmli (Hames, 2002). Isolat inhibin dalam buffer 20 mM Tris-Cl ditambahkan 20 ml RSB (1:1) dengan penambahan 2-mercaptoethanol (MP Biomedicals, Cat No 194834). Sampel dipanaskan selama 5 menit pada suhu 100 °C. Sampel dan marker (Fermentas, *pre stained*, Cat No 00022521) dimasukkan ke dalam sumuran (± 30 ml). *Running* elektroforesis dilakukan pada 110 V dan *constant current* 28 mA dalam *running buffer* (0,025 M Tris, 0,2 M Glisin, 0,1% SDS) hingga *tracking dye* mencapai 0,5 cm di atas dasar gel. Distribusi pita protein dapat diketahui dengan pewarnaan gel menggunakan larutan staining CBB selama 10 menit kemudian dibilas dengan larutan destaining sampai pita terlihat jelas.

Purifikasi Isolat Inhibin dengan Metode Elektroelusi

Gel hasil elektroforesis (SDS-PAGE) yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita dengan berat molekul target (dikonfirmasi sebelumnya dengan metode *Western Blotting*). Potongan gel kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan dan ditambahkan 0,02 M *buffer phosphat* hingga terendam. Kantong selofan kemudian dimasukkan ke dalam *chamber*

elektroelusi yang mengandung 0,01 M *buffer phosphat*, kantong selofan diposisikan terendam di dalam *buffer phosphat*. Elektroelusi dilakukan di dalam *cool chamber* 4 °C, pada 250 V, 20 mA selama satu malam. Protein yang terelusi diperoleh dengan presipitasi cairan elusi pada kantong selofan. Presipitasi dilakukan dengan menambahkan 97% etanol dingin (Merck, Cat No K36773783) dan diinkubasi selama satu malam, pada suhu 4 °C. Sampel kemudian disentrifus pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Pelet yang diperoleh dikering-anginkan dan ditambahkan dengan *buffer*. Selanjutnya sampel dapat disimpan pada suhu -20 °C.

Produksi Anti-Inhibin sebagai Antibodi Poliklonal

Isolat inhibin kultur dan non-kultur hasil elusi diimunisasikan masing-masing pada 3 ekor kelinci. Kelinci yang digunakan adalah kelinci jenis *New Zealand White*. Penggunaan hewan coba untuk penelitian ini, telah mendapatkan sertifikasi laik etik dari lembaga Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya, Malang.

Imunisasi dilakukan secara subkutan dengan dosis 150 μ l isolat inhibin ditambahkan 150 μ l *adjuvant* dengan konsentrasi total volume 0,3 ml/injeksi mengandung 145 μ g antigen. Penyuntikan primer menggunakan *adjuvant* CFA (Sigma, Cat No F-5581), sedangkan penyuntikan *booster* menggunakan IFA (Sigma, Cat No F-5506) dengan perbandingan 1:1. Serum pre-imunisasi diambil 1 minggu sebelum imunisasi. Serum post-imunisasi diambil selama 5 minggu setelah imunisasi II dan III. Sampel darah kelinci yang diambil dikubasi pada temperatur ruang dan disentrifus 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh disimpan untuk tahapan selanjutnya. Pemurnian antibodi dilakukan dengan presipitasi amonium sulfat (Merck, Cat No A-801717712) dengan kejenuhan 50%.

Uji spesifisitas dengan Western Blotting

Uji ini dilakukan berdasarkan metode Towbin (Walker, 2002) untuk mengetahui protein inhibin dapat bereaksi secara spesifik dengan antibodi hasil induksinya. Gel hasil elektroforesis beserta kertas saring *Whatman* dan membran NC direndam dalam *blotting buffer*. Ketiga komponen tersebut disusun mulai dari bawah ke atas berturut-turut 7 lembar kertas saring, membran NC gel, dan 7 kertas

saring pada *semi-dry system transblot* (BioRad). Transfer dilakukan pada 0,16 V dan 0,35 mA selama 1,5 jam pada suhu ruang. Membran hasil transfer kemudian diwarnai dengan *Ponceau* untuk mengetahui apakah protein pada gel sudah tertransfer ke membran NC, selama 5 menit kemudian dibilas dengan akuades. Protein dikatakan sudah tertransfer bila terdapat gambaran pola pita protein pada membran sesudah membran dibilas. Membran NC direndam dalam *blotto* 5% (5% susu skim dalam PBST) selama 60 menit sambil diagitasi, kemudian dicuci dalam PBST 3x5 menit. Membran NC untuk konfirmasi pita target diinkubasi dengan *Mouse* anti-inhibin subunit α monoklonal (Neomarkers, Fremont CA, Cat No MS-1863-S0) sedangkan membran NC untuk karakterisasi antibodi diinkubasi dalam antibodi primer 1 dan antibodi primer 2 untuk masing-masing di kedua isolat inhibin (1:200 dalam larutan *blotto*). Antibodi primer 1 adalah anti-inhibin isolat kultur sedangkan antibodi primer 2 adalah anti-inhibin isolat non-kultur. Masing-masing perlakuan kemudian diinkubasi selama satu malam dalam refrigerator, dan dicuci dalam PBST 3x5 menit setelah masa inkubasi selesai. Membran ditambahkan antibodi sekunder *Antimouse IgG AP conjugated* (Biomedicals, Cat No 5929103909) untuk perlakuan konfirmasi pita target sedangkan *Anti-Rabbit IgG AP conjugated* untuk perlakuan karakterisasi antibodi (1:2500) selama 1 jam pada suhu ruang, setelah itu dicuci kembali dengan PBST 4x5 menit. Membran selanjutnya direndam dalam BCIP/NBT (KPL, Cat No 50811) dalam ruang gelap selama satu malam. Hasil yang diperoleh dibandingkan berdasarkan pita yang terwarnai pada membran.

Metode 2 Dimensi SDS-PAGE

Pembuatan gel dalam tubing

Gel dibuat dari larutan yang mengandung urea 8,5 mol/liter, 30% T-akril, dan ddH₂O selanjutnya divorteks dan didegas dalam desikator selama 15 menit. Langkah berikutnya ditambahkan 2% ampholit (pH 3,5-9 dan pH 4-7), APS 10%, TEMED dan dimasukkan dalam *tubing* dengan posisi mendatar.

Tubing yang telah terisi gel, disusun pada alat dua dimensi elektroforesis. Tangki bawah diisi dengan 10 mM H₃PO₄, tangki di atas dengan 20 mM NaOH sampai permukaan

kawat pada alat tersebut terendam. Dilakukan pre-running pada 400 V, 30 mA selama 30 menit.

Running

Sebanyak 15 μ l isolate protein inhibin dilarutkan dengan 15 μ l RSB dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian disimpan pada suhu -20 °C selama 5 menit dan sebelum running sample dipanaskan dalam waterbath selama 2 menit. Sampel dimasukkan ke dalam tubing dan dilakukan running pada voltase konstan 400 V, 30 mA selama satu malam. Kemudian gel dikeluarkan dari tubing dengan menggunakan spuit yang berisi aquades, dan direndam dalam larutan 5% mercaptoethanol selama 30 menit.

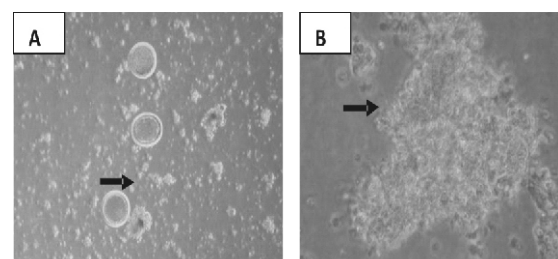
Running elektroforesis SDS PAGE

Gel diletakkan di atas 12% gel akrilamid. Running elektroforesis SDS PAGE dilakukan pada voltase konstan 130 V, constant current 30 mA selama 2,5 jam. Selanjutnya gel dikeluarkan dan dilakukan pewarnaan dengan commasie brilliant blue dan silver staining.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aspirasi Granulosa dari Ovarium Kambing

Folikel yang dipilih sebagai sumber granulosa adalah folikel permukaan ovarium yang diduga berada pada fase folikel sekunder dengan diameter ≥ 2 mm. Hasil Penelitian Siregar (2006) menunjukkan bahwa sel granulosa mengekspresikan inhibin. Dari penelitian yang dilakukan Siregar *et al.* (2005-2006) diyakini, hasil penelitiannya dapat dikembangkan untuk produksi antibodi monoklonal terhadap inhibin dengan kontinuitas kualitas yang terjaga melalui produksi hibridoma yang mengekspresikan Mab-inhibin.



Gambar 1. Hasil isolasi sel granulosa

A. Sel granulosa dengan oosit yang telah terpisah

B. Sel granulosa tanpa oosit

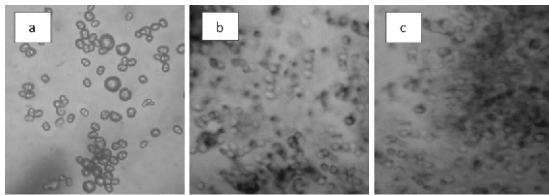
→ Sel granulosa

Pada penelitian ini, koleksi oosit dilakukan dengan metode aspirasi. Pemisahan oosit dengan sel granulosa dilakukan dengan pengaturan penekanan pipet *Pasteur* yang dilihat di bawah mikroskop. Dari oosit tersebut akan diperoleh sel-sel granulosa yang telah terpisah (Gambar 1).

Proses pemisahan ini dilakukan pada cawan petri dalam 5 ml larutan PBS pH 7,4. Sel granulosa yang diperoleh kemudian dipindah ke dalam tabung efordorf yang berisi PBS pH 7,4 yang mengandung PMSF untuk menjamin agar sel granulosa yang diperoleh tidak dihidrolisis oleh enzim proteolitik, karena PMSF berfungsi sebagai anti protease. Sel granulosa yang diperoleh segera dilakukan kultur, melalui tahapan optimasi medium dan pengamatan pertumbuhannya.

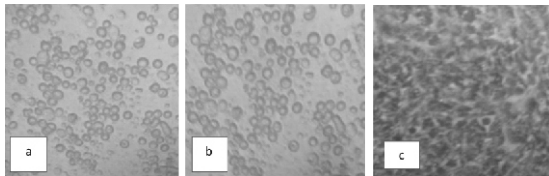
Kultur Sel Granulosa

Perkembangan hasil kultur granulosa yang dipakai sebagai sumber molekul inhibin yang digunakan untuk kontinuitas produksinya terlihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kultur sel granulosa pada 3 hari pertama (a. hari ke-1; b. hari ke-2; c. hari ke-3)

Melalui optimasi kondisi kultur sel granulosa diperoleh sel yang konfluens yang siap dipanen untuk sumber isolat inhibin. Hasil kultur pada minggu-minggu berikutnya, yang siap untuk dipanen terlihat pada Gambar 3.

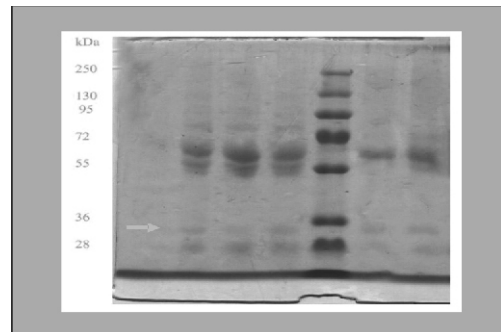


Gambar 3. Kultur sel granulosa pada perkembangan berikutnya dan siap panen

Karakterisasi Inhibin dengan SDS-PAGE

Isolat inhibin yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat yang berasal dari *crude* protein non-kultur (NK) dan kultur (K) sel granulosa kambing. *Crude* protein kultur merupakan subkultur sel granulosa. Sampel *crude* protein ditambahkan RSB yang mengandung *2-mercaptoethanol* sebelum SDS

PAGE. Hasil SDS PAGE dari *crude* protein non-kultur dan kultur dapat dilihat pada Gambar 4. Karakterisasi inhibin dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan SDS-PAGE yang diikuti dengan metode elektroelusi pada molekul yang telah dikonfirmasi dengan Mab-goat-inhibin. Pada Gambar 4 terlihat pita urutan 1-3 adalah pita hasil kultur sedang pita 4-5 merupakan *crude* non-kultur. Pita protein *crude* protein kultur tampak lebih tebal dibandingkan *crude* protein non-kultur.



Gambar 4. Isolasi inhibin dengan metode SDS-PAGE (Panah menunjukkan berat molekul 32 kDa; M: Marker)

Hasil penelitian menunjukkan inhibin hasil isolasi inhibin baik dari hasil kultur granulosa ataupun sel granulosa non-kultur didapatkan pita dengan BM 32 kDa. Hal ini sesuai dengan laporan Siregar (2006) yang menemukan adanya pita molekul protein dengan berat molekul (BM) 32 kDa dari sel granulosa kambing yang diyakini sebagai molekul inhibin.

Uji Konfirmasi berat molekul inhibin dengan dengan Metode Western Blot Menggunakan Mab-Inhibin

Untuk mengetahui berat molekul inhibin hasil isolasi akan dikonfirmasi dengan metode *Western Blot*. Gambar 5 menunjukkan bahwa berat molekul inhibin adalah 32 kDa.

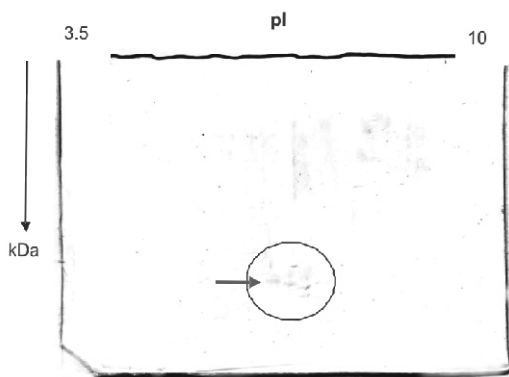


Gambar 5. Konfirmasi isolat inhibin dari kultur granulosa dan sel granulosa non kultur dengan Metode Western Blot (Anak panah menunjukkan pita dengan berat molekul 32 kDa)

Pita hasil SDS-PAGE pada Gambar 5 dengan berat molekul 32 kDa yang tampak pada hasil *Western Blot* adalah molekul inhibin hasil isolasi dari sel granulosa hasil aspirasi (1-2) dan kultur (3-4) granulosa yang dikenali oleh Mab-inhibin.

Titik Isoelektrik Protein 32 kDa

Isolat inhibin hasil penelitian ini dilanjutkan untuk mengetahui titik isoelektriknya dengan metode *Isoelectric Focusing* (IEF) gel elektroforesis. *Isoelectric Focusing* (IEF) gel elektroforesis adalah teknik untuk memisahkan protein pada muatan bersihnya (tanpa muatan/titik isoelektrik). Pada kondisi ini, protein bermigrasi sampai posisi gradien pH-nya tidak bermuatan atau titik isoelektriknya nol (Walker, 1994). Hasil IEF gel elektroforesis protein 32 kDa dari inhibin ini seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil IEF gel elektroforesis protein 32 kDa dari inhibin (Panah merah menunjukkan spot pI dari molekul inhibin)

Gambar 6 menunjukkan adanya beberapa spot yang merupakan molekul inhibin dengan BM sebesar 32 kDa. Hasil ini menunjukkan bahwa molekul inhibin dari kultur granulosa tidak bermuatan pada titik isoelektrik 5-6, tergantung dari total kandungan asam amino penyusunnya. Hasil ini dapat dijadikan sebagai acuan untuk melakukan konfirmasi spot ini dengan Mab-inhibin pada penelitian selanjutnya, untuk pengembangan monoklonal antibodi terhadap inhibin yang diinduksi dari molekul inhibin dari kultur granulosa.

KESIMPULAN

Molekul inhibin hasil isolasi dari kultur dan non-kultur granulosa kambing mempunyai berat molekul 32 kDa. Kultur granulosa dapat mengekspresikan inhibin lebih banyak

dibandingkan non-kultur dan dapat dipisahkan dengan 2 dimensi elektroforesis dengan ditemukannya beberapa spot yang dapat diuji dan dikembangkan untuk produksi Mab inhibin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2007.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez R.H., J.B.V. de Carvalho, A. Rosa, E. Silva, C.N. Perone, M.T.C.P. Ribela, and E.B. de Oliveira Filho. 1998. Endocrine profiles and ovulation rate of cows superovulated with FSH following passive immunization against steroid free-bovine follicular fluid. **Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 35(6):34-45.
- Anonimus. 2006. Populasi Kambing Menurut Provinsi. <http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/2005/pop-kambing.htm>
- Araki K., K.Y. Arai, G. Watanabe, and K. Taya. 2000. Involvement of inhibin in the regulation of Follicle Stimulating Hormone secretion in the young adult male Shiba goat. **J. Andrology.** 21(4):558-565.
- Donadeu F.X. and O.J. Ginther. 2001. Effect of number and diameter of follicle on plasma concentration of inhibin and FSH in mares. **Reproduction.** 121: 897-903
- Hillard M.A., B.M. Bindon, B. King, T. O'Shea, C.A. Andrews, and G.N. Hinch. 1996. Immunological manipulation of ovulation rate for twinning in cattle. **J. Reprod. Fert. Suppl.** 49: 351-364.
- Ishigame H., M.S. Medan, M. Kawaguchi, A. Fukuda, G. Watanabe, K.Y. Arai, and K. Taya. 2005. Induction of superovulation by immunoneutralization of endogenous inhibin in immature rats. **J. Reprod. and Developm.** 51(5): 559-566.
- Kaneko H., Y. Nakanishi, K. Taya, H. Kishi, G. Watanabe, S. Sasamoto, and Y. Hasegawa. 1993. Evidence that inhibin is an important factor in regulation of FSH secretion during the mid-luteal phase in cows. **J. Endocrinol.** 136:35-41.

- O'Shea T., M.A. Hillard, S.T. Anderson, B.M. Bindon, J.K. Findlay, C.G. Tsonis, and J.F. Wilkins. 1994. Inhibin immunization for increasing ovulation rate and superovulation. **Theriogenology**. 41:3-17.
- Robertson D.M., N. Cahir, J.K. Findlay, H.G. Burger, and N. Groome. 1997. The biological and immunological characterization of inhibin A dan B forms in human follicular fluid and plasma. **J. Clin. Endoc. And Metabolism**. 82(3):889-896.
- Siregar T.N., Aulanni'am, T. Susilawati, G. Riady, Hamdan, dan T. Armansyah. 2006. Karakterisasi biokimiawi protein inhibin dari sel granulosa folikel ovarium kambing. **J. Anim. Product**. 8(2):76-82.
- Siregar T.N., Aulanni'am, Y. Linggi, G. Riady, Hamdan, dan T. Armansyah. 2005a. Profil titer antibodi inhibin (anti-inhibin) hasil induksi protein inhibin sel granulosa kambing pada kelinci. **Prosiding Seminar Nasional Biologi dan Pembelajarannya**. 3 Desember 2005, Universitas Negeri Malang, Malang:94.
- Siregar T.N., Aulanni'am, T. Susilawati, and Y. Linggi. 2005b. 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.
- Suyadi. 2003. Potensi reproduksi ternak kambing dan domba. Makalah disampaikan pada Seminar Regional **"Prospek Pengembangan Ternak Kambing/Domba di Indonesia"** di Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang, 25 Oktober 2003.
- 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.
- Walker J.M. 2002. **The Protein Protocols Handbook**. Humana Press. Totowa, New Jersey.