

Bioaktivitas *human* Menopause Gonadotrophin (*hMG*) dan *hMG* Terglikosilasi (*hMGdG*) dari Urin Perempuan Pascamenopause terhadap Terbentuknya *Cleavage* Embrio Sapi Secara *In Vitro*

(Bioactivity *human* Menopause Gonadotrophin (*hMG*) and *hMG* Deglycosylated (*hMGdG*) of Urine of Postmenopause Woman Toward *Cleavage* Embryo of Cattle in Vitro)

Herry Agoes Hermadi*, L. Mahaputra*, Agus Abadi**

ABSTRACT

The aim of this study was to produce *hMG* from the urine of post-menopausal women and to evaluate the influence of glycan removal from *hMG* glycoprotein molecule undergoing deglycosylation (*hMGdG*) in shortening the onset of cleavage embryo of bovine in vitro. The experiments were performed on: 1) the identification of *hMG* from the urine of postmenopausal women by confirming the glycoprotein characteristic; 2) the examination of biochemical characteristic of *hMG* deglycosylated using N-glycanase; 3) the influence of deglycosylated *hMG* on the onset of embryo of bovine cleavage in vitro. Urine samples were collected from 30 postmenopausal women. The result of SDS-PAGE demonstrated protein bands with molecular weight ranging from 19.4–107 kDa. Western Blot using anti-*hMG* monoclonal antibody (Catalogue CSA-614 Stressgen Bioreagents) showed that immunoreactivity at the band with molecular weight of 30 kDa which was a glycoprotein. The band result of Western blot referred with MW 30 kDa was glycoprotein. Glycoprotein is a protein molecule attached to carbohydrate molecule by using Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit 23260. The concentration rate of glycoprotein was 99860.00 µg/ml (PAS), protein was 66939.29 µg/ml (Biuret) and carbohydrate 32920.71 µg/mL (PAS). Concentration ratio of glycoprotein, protein and carbohydrate from molecule *hMG* was 3: 2: 1. *hMG* from the urine of the 30 postmenopausal women was confirmed with the 30 kDa molecular weight glycoprotein characteristic. The Chemical characteristic of *hMG* undergoing enzymatic deglycosylation using N-glycanase reduced the molecular weight into 26 kDa. The deglycosylated *hMG* reduced the onset of cleavage embryo of bovine in vitro from 24 to 20 hours ($p < 0.01$).

Key words: *hMG*, *hMGdG*, embryo cleavage, glycoprotein, deglycosylation, in vitro

PENDAHULUAN

Kebutuhan hormon gonadotropin untuk tujuan terapi kemajiran dan superovulasi pada produksi embrio sapi selama ini dipenuhi dari PMSG, *human Chorionic Gonadotrophin* (*hCG*), FSH–LH dari ekstrak hipofisa hewan dan FSH–LH rekombinan. Penggunaan *hMG* untuk superovulasi pada sapi potong pertama kali diperkenalkan oleh **Alcivar et al.** (1992). Penelitian tentang *hMG* untuk induksi birahi dan kebuntingan pada ternak kambing pertama dilakukan di Universitas Airlangga menunjukkan hasil yang cukup baik (**Ratnani dan Hermadi**, 1992). Sampai akhir tahun 1995, kebutuhan dunia akan hormon gonadotropin yang berasal dari urin perempuan pascamenopause dipenuhi dari China,

Europa dan Amerika Latin untuk pabrik *hMG* (*Menotropin*) di USA. Di Indonesia urin perempuan pascamenopause belum pernah dimanfaatkan sebagai sumber *hMG* berdasarkan peta urin gonadotropin (**Lunenfeld**, 2004).

Hormon FSH–LH sangat dibutuhkan untuk proses produksi embrio secara *in vitro* *hMG* terdiri dari kombinasi hormon FSH dan LH. Reseptor FSH di ovarium terdapat di sel granulosa yang berperan langsung pada perkembangan folikel saat maturasi oosit (**Simoni et al.**, 1997). Reseptor LH lebih banyak di sel *theca* ovarium yang berperan langsung pada proses steroidogenesis. Pada proses IVM dibutuhkan penambahan hormon FSH dan LH. Sebelum dilakukan IVM dan IVF pada manusia, pemberian terapi *hMG*

* Departemen Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

** Departemen Obgin Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga

ataupun rFSH pada resepien menunjukkan kemampuan yang sama jika digunakan hingga tingkat *Intra Cytoplasmic Injection* (ICI) (Jacob *et al.*, 1998; Weissman *et al.*, 1999). Pemberian FSH-LH dengan komposisi seimbang (dosis 10 µg/ml) pada fertilisasi *in vitro* ternak ruminansia memberikan hasil yang sangat baik (Martino *et al.*, 1994; Goto dan Iritani, 1992; Sirard dan Lambert, 1985).

In vitro growth pada sapi dimulai dari perkembangan preantral folikel yang diameternya 180–250 µm sampai menjadi mature folikel di sapi mencapai > 8,5 mm. Pertumbuhan folikel dalam IVG dimulai dari pertumbuhan primordial folikel menjadi folikel primer, folikel sekunder, *early antral follicle* dan folikel *de graff*. Peran FSH–LH pada saat pertumbuhan folikel setelah mencapai folikel sekunder. Pertumbuhan folikel dan sel oosit sangat dipengaruhi oleh *growth factor* yang meliputi *somatic* dan *gamete derived growth factor* untuk pertumbuhan folikel dan oosit. *Oocyte derived factor* meliputi *oocyte derived growth differentiation factor* (GDF), *defferentiation bone morphogenetic protein* (BMP), *activin*, *insulin like growth factor* (IGF) dan binding proteinnya (IGFBP), *transforming growth factor β* dan *Tyrosine kinase receptor* (KL). *Somatic derived factor* meliputi *anti mulerian hormone* (AMH), *epidermal growth factor* (EGF), *retino blastoma protein* (RB1) dan *basic fibroblastic growth factor* (bFGF) (Picton *et al.*, 2008). Koordinasi dan komunikasi pertumbuhan oosit dan somatik folikuler terjadi komunikasi hormonal (endokrin), Ca^{2+} , granulos sel proliferasi, deferensiasi dan meiosis juga dibantu oleh transkripsi *factor oosit germline α* (FIGα) yang diekspresikan oleh oosit. Pertumbuhan awal oosit juga dipengaruhi *transforming growth factor β family*, *growth deferentiation factor* (GDF9) dan *bone morfogenetic protein* (BMP 15) (Eppig *et al.*, 2002).

Isoform dari glikoprotein hormon seperti hFSH merupakan variasi bentuk komposisi karbohidrat yang mempunyai fungsi heterogen dan perbedaan struktur oligosakarida yang dapat diaplikasikan secara *in vitro* maupun *in vivo* (Aguirre *et al.*, 2003). Penghilangan asam sialat atau disebut sebagai *less acidic* dengan menggunakan *electrical 20 charge isoform* akan terjadi perubahan pH dari 7 menjadi 3,8 pada kultur sel granulos tikus *culture oocytes complex* (COC), akan menurunkan α -*inh* mRNA untuk meningkatkan mRNA dan meningkatkan stimulasi aktivasi aromatisasi androgen dan produk estrogen serta meningkatkan aktivitas *enzyme tissue plasminogen activator* (tPA) tepatnya pada *cytochrom P450 aromatase* (P450 arom) dan terjadi pula peningkatan kadar cAMP. Selain itu pembentukan atau perubahan formasi isoform hFSH juga dapat dilakukan penambahan anti-hFSH pada

kultur sel granulos dan pemberian N-*glicanase* yang disebut sebagai deglikosilasi (Aguirre *et al.*, 2003).

human Menopause Gonadotropin (hMG) yang dihasilkan dari urin perempuan pascamenopause memberikan efek terapi yang baik dan relevan pada perempuan resepien atau penderita infertil, bahkan setelah terapi hMG dapat langsung terjadi proses *in vivo* maturasi dan dilanjutkan *in vitro* fertilisasi (IVF) pada manusia (Daya *et al.*, 1995; Daya dan Gunby, 1999; Kubo, 2005). Terapi dengan hMG menghasilkan oosit dan perkembangan embrio yang sangat memuaskan, yang hampir sama bila dibandingkan dengan menggunakan *recombinant human FSH* (rhFSH). Pemberian hMG yang dilanjutkan dengan perlakuan IVF dapat memicu mitosis oosit hingga fase metafase (Imthurn, *et al.*, 1996; Mercan *et al.*, 1997; Agarwal *et al.*, 2000). hMG efektif untuk terapi infertilitas maupun untuk perlakuan sebelum IVF guna merangsang proses maturasi folikel, ovulasi dan respon ovarium, serta pertumbuhan embrio yang dihasilkan, di samping itu harganya yang jauh lebih murah (Westergaard *et al.*, 1996; Koninckx, 2001; Huang *et al.*, 2004). hMG mempunyai peluang untuk dikembangkan karena sumbernya yang mudah diperoleh (Alcivar *et al.*, 1992). Anderson *et al.* (2000) dan Zambrano *et al.* (2007) melaporkan, proses hilang rantai penghubung antara gula mannose fruktosa dan asam sialat pada cabang oligosakarida hormon gonadotrophin FSH-LH like, secara *in vivo*, mempercepat aktivitas folikulogenesis hewan dan memperpendek lama hidup dalam plasma darah. Di sisi lain, secara *in vitro*, FSH-LH like yang tidak mengandung hubungan antara gula manosa fruktosa dan asam sialat mempercepat induksi akumulasi cAMP di dalam *Cumulus Culture-Oocyte-Compleks* (COC) dari folikel. Tujuan penelitian ini untuk memonitor aktivitas biologis secara *in vitro* akibat dampak pemberian hMGdG.

MATERI DAN METODE

Urin perempuan pascamenopause yang ditampung pada pagi hari sebanyak 100 ml per orang disentrifus dengan kecepatan 1000 xg selama 15 menit dengan suhu 4° C. Sentrifus ini bertujuan untuk memisahkan sel-sel metabolit dan bagian endapan dibuang. dilakukan sentrifugasi 1000 xg pada suhu 4° C selama 20 menit (Hermadi, 2001). Hasil supernatan disaring hingga jernih dan dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer dengan menggunakan kertas saring. Prosedur di atas dilakukan hingga mendapatkan supernatan sebanyak 50 ml. Selanjutnya sampel urin digunakan untuk prosedur pemeriksaan isolasi glikoprotein.

Dibutuhkan 200 µl sampel urin dibuat homogen dengan penambahan PBST–PMSF 5 kali sampel urin kemudian supernatan dimasukkan kedalam tabung mikro disonifikasi selama 10 menit kemudian divortex dan disentrifus 3000 xg selama 15 menit ditambahkan etanol absolut dingin 1:1 diinkubasi dalam lemari pendingin selama 1 jam atau semalam. Kemudian disentrifugasi 5.000 xg selama 15 menit kemudian endapan dikeringanginkan hingga bau etanol hilang dan ditambah *buffer tris* Cl 20 mM akan diperoleh isolat protein selanjutnya untuk pemeriksaan SDS-PAGE (Aulani'am, 2004).

Teknik identifikasi protein hMG dengan Western blot

Western blot dilakukan dengan menggunakan fragmen pita hMG yang telah dijalankan dalam SDS-PAGE dan dipindah ke membran Nitroselulose (Molecular Station, 2006). Membran dihambat dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-HCl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama satu jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung 1% BSA dengan anti-hMG sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti-rabbit IgG label AP, pengenceran 1:1000) dan ditambahkan substrat *western blue*. Pita yang muncul adalah pita hMG sehingga bisa diketahui BM isolat hMG.

Teknik isolasi protein hMG dengan elektroelusi

Gel SDS-PAGE yang tidak diwarnai dipotong sepanjang pita yang dikehendaki. Masing-masing potongan gel dimasukkan ke dalam kantong selofan dan direndam dengan 0,05 M *phosphate buffer* (PB) sebanyak 1–2 ml. Kemudian dimasukkan dalam *chamber* elektroelusi yang mengandung *phosphate buffer* 0,01 M. Selanjutnya dilakukan elektroelusi di dalam *cool chamber* 4° C (dalam *refrigerator*), *power supply* dinyalakan dengan kekuatan 220 V, 20 mA selama semalam. Protein yang sudah terelusi dapat ditentukan dengan cara melakukan pemotongan *gel acrylamide* dan diwarnai dengan *staining commasie blue* selama 20 menit. Kemudian ditambahkan pewarna ulang, bila tidak terdapat pita berarti protein sudah terelusi. Selanjutnya cairan yang mengandung protein yang terdapat dalam kantong selofan dikeluarkan, kemudian dipresipitaskan dan dimurnikan untuk mendapatkan protein yang dimaksud.

Teknik deglikosilasi hMG

Isolat hMG sebanyak 500 µg ditambah pada 45 µl *buffer* inkubasi. Kemudian ditambahkan 2,5 µl SDS dengan konsentrasi akhir 0,1% dan dilakukan proses denaturasi terhadap glikoprotein melalui pemanasan 100° C selama 5 menit dan selanjutnya dibiarkan sampai dingin. Ditambahkan

2,5 µl NP-40 dengan konsentrasi akhir adalah 0,75% dan ditambahkan 2 µl *N-Glycanase* semalam pada suhu 37° C. Selanjutnya disimpan pada -20° C. Isolat dikaterisasi berat molekul protein hMGdG melalui SDS-PAGE. Selanjutnya hMGdG dipakai proses *in vitro* maturasi dan fertilisasi.

Teknik karakterisasi biokimiawi hMGdG

Karakterisasi hMGdG dilakukan untuk mengetahui sifat biokimiawi hMGdG meliputi berat molekul protein berdasarkan teknik SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *Commasie Brilliant blue R-250* (Aulanni'am, 2004).

Koleksi sel telur

Pengamatan pada oosit, sejumlah cairan folikel hasil pengisapan dituangkan ke dalam cawan petri dan diperiksa di bawah mikroskop inverted, oosit diambil dengan pipet pasteur modifikasi yang berdiameter 300-500 µm, dan diletakkan di cawan petri yang lain (berukuran lebih kecil) yang berisi media pencuci. Oosit diperiksa lagi di bawah mikroskop untuk ditentukan kualitasnya (Mahaputra dkk., 1999).

Uji biologis hMG dan hMGdG terhadap kecepatan waktu terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro*

Setelah kualitasnya semua oosit terlebih dahulu dicuci dalam medium pencuci sebanyak 3–4 kali dan pencucian terakhir dengan *Tissue Culture Medium 199* (TCM 199) sebanyak 2,5–3,0 ml. Kemudian oosit yang memiliki kumulus kompak dipindah ke dalam medium pematangan dalam bentuk tetes (*drop*) masing-masing 100 µl dalam cawan petri masing-masing 20 oosit. Total oosit yang digunakan dalam penelitian ini 100 oosit yang telah disiapkan 2 jam sebelumnya dalam inkubator CO₂ 5%. Masing-masing medium terdiri dari P1 = Pemberian hMG hasil penelitian dosis I 1 µg/ml secara *in vitro*; P2 = Pemberian hMG hasil penelitian dosis II 4 µg/ml secara *in vitro*; P3 = Pemberian hMGdG hasil penelitian dosis I 1 µg/ml secara *in vitro*; P4 = Pemberian hMGdG hasil penelitian dosis II 4 µg/ml secara *in vitro*; dan K = Kelompok kontrol, tidak diberi hMG atau hMGdG *in vitro* tetapi PMSG 15 IU.

Medium pematangan dibuat dalam cawan petri steril ukuran 35 mm dalam bentuk tetes sebanyak 4 tetes setiap 100 µl. Dalam tiap tetes medium dapat dibiakkan sebanyak 10 oosit dan selanjutnya ditutup dengan minyak mineral. Pembiasaan dengan ketiga medium dilakukan dalam inkubator yang mengandung 5% CO₂ dengan kelembaban 95–100% dan suhu 39° C. Media diinkubasi selama 24 jam (Mahaputra, 2007). Tahap selanjutnya adalah *In*

Vitro Insemination (IVI). Dua jam sebelum inseminasi 2 pipa isap mini yang mengandung 10–15 juta/sel mani hidup dilakukan pencairan selama 1 menit di dalam air hangat 37° C. Di lain tempat sudah disediakan 3 ml EBSS (*Earle's Balance Salt Solution* PH 7,4) di dalam vial plastik berbentuk kerucut volume 11 ml. Seluruh isi pipa isap ditumpahkan di atas permukaan media EBSS lalu disentrifus 1800g selama 10 menit, lalu filtrat dibuang hingga tinggal endapan. Tindakan ini diulang 2 kali sehingga pellet terakhir setelah ditambahkan EBSS spermatozoa yang hidup dapat berenang ke atas ke permukaan media EBSS (*swim up*) dalam waktu 30 menit, sehingga spermatozoa yang kurang baik motilitasnya atau mati tetap berada di dasar vial atau maximum dipertengahan media dalam vial. Untuk mendapatkan spermatozoa motil dan tidak ada cemaran debris maka spermatozoa diambil dari permukaan media. Bersamaan itu pula pada tempat cawan petri lain sudah disiapkan "*Rosett Like Patern*" dibuat dari media EBSS yang ditempatkan pada bagian pusat sebanyak 100 µl dan dikelilingi dengan $\pm 15 \mu\text{l}$ media EBSS dalam 6 tetes mengelilingi sekitarnya. Setiap tetes dihubungkan dari pusat ke tepi sehingga merupakan bentukan mawar, di ujung bentuk mawar dimasukkan 10 telur yang sudah diinkubasi selama 24 jam dalam proses maturasi. Sedangkan spermatozoa yang sedang mengalami waktu kapasitasasi melalui proses pelelehan, pencucian dan *swim up* ditempat-

kan sebanyak 30 µl yang mengandung total $1,25-1,5 \times 10^6$ spermatozoa motil dipusat media, sehingga spermatozoa motil akan terseleksi mencari jalan masuk ke dalam ujung rosset yang ada oositnya. Setelah waktu dibedakan 20 dan 24 jam saat fertilisasi di dalam inkubator 5% CO₂ suhu 38,5° C, maka oosit yang telah dibuahi dicuci dengan TCM 199, lalu dipindahkan kembali ke dalam drop maturasi diikuti perkembangannya hingga 24 jam. Setelah 24 jam fertilisasi, observasi pembelahan dilakukan dengan melihat jumlah blastomer di dalam embrio (**Mahaputra, 2007**).

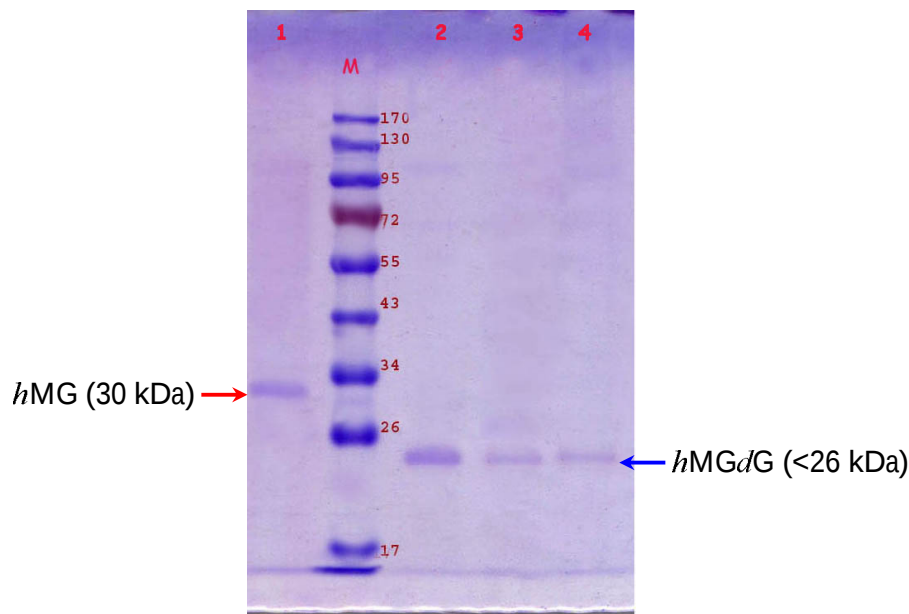
Analisis Data

Data yang diperoleh pada uji biologis *hMG* dan *hMGdG* berupa persentase oosit yang mengalami fertilisasi dan terbentuknya *cleavage* embrio *in vitro* hingga 16 dan 32 sel dianalisis dengan Anava factorial yang dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test* 5% (**Steel dan Torrie, 1995**).

HASIL DAN DISKUSI

Isolasi dan karakterisasi biokimiawi glikoprotein *hMG* dari urin perempuan pascamenopause

Hasil isolasi glikoprotein *hMG* dari urin perempuan pascamenopause, kemudian dilakukan karakterisasi dengan teknik *Western blot* yang didapatkan glikoprotein dengan

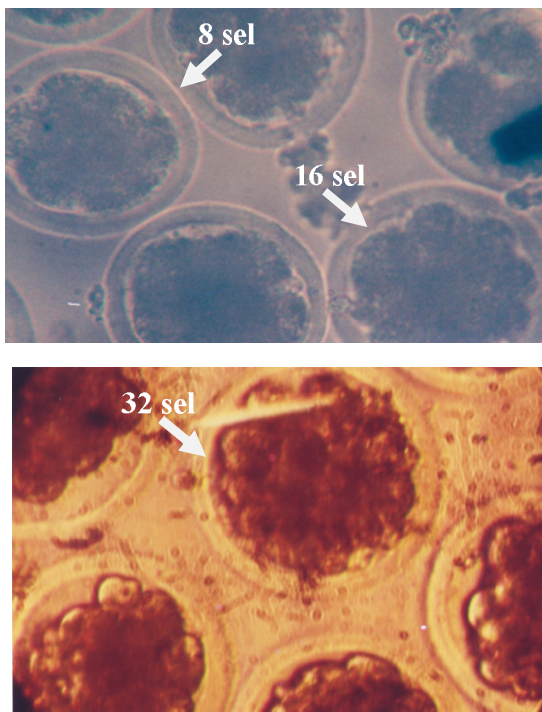


Gambar 1. Hasil analisis protein *hMG* hasil elektroelusi dan *hMGdG* hasil deglikolisasi. M = Marker Protein, 1 = sampel *hMG* hasil elektroelusi (sebelum deglikolisasi), 2-4 = hasil deglikosilasi *hMG* (*hMGdG*), → = pita menunjuk pita pita dengan BM 30 kDa, ⇒ = pita protein *hMG* hasil deglikosilasi di bawah 26 kDa.

BM 30 kDa. Hasil tersebut digunakan sebagai dasar untuk isolasi glikoprotein *hMG* dan kemudian dianalisis lagi dengan teknik SDS-PAGE. Glikoprotein *hMG* dengan BM 30 kDa dilakukan proses deglikosilasi enzimatis menggunakan enzim *N-glycanase* dan dikonfirmasi dengan SDS-PAGE. Hasil isolasi *hMG* dan deglikosilasi *hMGdG* disajikan pada *Gambar 1*.

Uji biologis *hMG* dan *hMGdG* terhadap kecepatan waktu terbentuknya cleavage embrio sapi secara *in vitro*

Dokumentasi pengamatan secara mikroskopik perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* dimulai dari *cleavage* menjadi 8, 16 dan 32 sel embrio dapat dilihat pada *Gambar 2*.



Gambar 2. Perkembangan hasil fertilisasi *in vitro* 8, 16 dan 32 sel embrio. Pembesaran 200 $\times$.

Hasil analisis dengan uji Anava Faktorial menunjukkan bahwa rerata jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* untuk perlakuan (trial) pada berbagai waktu tersebut menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$). Rerata dan SD jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* pada berbagai waktu untuk perlakuan *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$, *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$, *hMGdG* 1 $\mu\text{g/ml}$, *hMGdG* 4 $\mu\text{g/ml}$ dan PMSG 15 IU pada berbagai waktu sebesar 45.278 ± 22.716 , 51.136 ± 23.784 , 65.056 ± 11.754 , 73.390 ± 14.689 ,

44.162 ± 5.703 . Berdasarkan hasil uji HSD 5% dapat diketahui bahwa jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* tertinggi didapatkan pada *hMGdG* 4 $\mu\text{g/ml}$ yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan *hMGdG* 1 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan hasil terendah didapatkan pada perlakuan *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$ dan PMSG 15 IU yang tidak berbeda bermakna dengan *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$.

Nilai rerata dan SD jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* pada berbagai perlakuan untuk waktu 20 jam dan 24 jam masing-masing sebesar 46.534 ± 20.2956 dan $65.075^b \pm 15.3569$. Hasil tersebut tidak menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$). Nilai rerata dan SD jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* untuk perlakuan kombinasi *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *hMGdG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *hMGdG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *hMGdG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam, *hMGdG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, PMSG 15 IU-20 jam dan PMSG 15 IU-24 jam sebesar 24.333 ± 3.388 , 66.222 ± 7.269 , 32.273 ± 4.272 , 70.0 ± 19.103 , 61.667 ± 14.218 , 68.444 ± 8.944 , 70.234 ± 18.365 , 76.545 ± 11.104 , 44.162 ± 6.049 dan 44.162 ± 6.049 . Pengaruh interaksi antara perlakuan dan waktu untuk jumlah ovum yang mengalami fertilisasi *in vitro* menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$).

Berdasarkan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa hasil tertinggi didapatkan pada perlakuan kombinasi *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *hMGdG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam dan 24 jam. Hasil yang sama didapatkan pada perlakuan kombinasi *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -24 jam, *hMGdG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam dan 24 jam, sedangkan hasil terendah didapatkan pada perlakuan kombinasi *hMG* 1 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam dan *hMG* 4 $\mu\text{g/ml}$ -20 jam yang menunjukkan perbedaan tidak bermakna ($p > 0,05$) dengan perlakuan kombinasi PMSG 15 IU-20 jam dan 24 jam.

Setelah dilakukan analisis statistik dengan uji Anava faktorial antara perlakuan (trial) dan waktu dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan sangat bermakna jumlah embrio sapi yang mencapai 16 sel baik terhadap trial ($p < 0,01$) maupun waktu ($p < 0,01$), namun didapatkan interaksi yang tidak signifikan antara trial dan waktu ($p > 0,05$). Jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 32 sel untuk perlakuan (trial) pada berbagai waktu tersebut menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$), namun terhadap waktu tidak didapatkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$) dan didapatkan interaksi yang tidak signifikan antara trial dan waktu ($p > 0,05$).

Rerata dan SD jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan pembelahan mencapai embrio 16 dan 32 sel dari berbagai waktu untuk perlakuan dapat dilihat pada *Tabel 1*. Berdasarkan hasil uji HSD 5% dapat diketahui

bahwa jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 16 sel tertinggi didapatkan pada *hMGdG* 4 µg/ml. Hasil yang sama didapatkan pada *hMG* 1 µg/ml, *hMG* 4 µg/ml, *hMGdG* 1 µg/ml dan *hMGdG* 4 µg/ml, sedangkan hasil terendah didapatkan pada perlakuan *PMSG* 15 IU yang tidak berbeda bermakna dengan *hMGdG* 1 µg/ml. Untuk oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 32 sel tertinggi didapatkan pada *hMGdG* 4 µg/ml. Hasil yang sama didapatkan pada *hMG* 1 µg/ml, *hMG* 4 µg/ml, *hMGdG* 1 µg/ml dan *hMGdG* 4 µg/ml, sedangkan hasil terendah didapatkan pada perlakuan *PMSG* 15 IU yang tidak berbeda bermakna dengan *hMG* 1 µg/ml, *hMG* 4 µg/ml dan *hMGdG* 1 µg/ml.

Tabel 1. Hasil Uji Biologi Perkembangan Fertilisasi *In Vitro* Hingga 16 dan 32 Sel terhadap Trial Berbeda pada Berbagai Waktu

Trial	16 sel		32 sel	
	Mean	SD	Mean	SD
<i>hMG</i> 1 µg/ml	14.000 ^b ± 13.6606		1.250 ^{ab} ± 3.9528	
<i>hMG</i> 4 µg/ml	16.854 ^b ± 18.2587		1.111 ^{ab} ± 3.5136	
<i>hMGdG</i> 1 µg/ml	10.000 ^{ab} ± 13.3024		2.222 ^{ab} ± 4.6849	
<i>hMGdG</i> 4 µg/ml	20.299 ^b ± 18.5560		7.727 ^b ± 10.7842	
<i>PMSG</i> 15 IU	0.000 ^a ± 0.0000		.000 ^a ± .0000	

^{a,b}Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 16 sel untuk waktu pada berbagai perlakuan (trial) tersebut menunjukkan perbedaan sangat bermakna ($p < 0,01$), sedangkan yang mencapai embrio 32 sel untuk waktu pada berbagai perlakuan (trial) tersebut tidak menunjukkan perbedaan bermakna ($p > 0,05$) (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Uji Biologi Perkembangan Fertilisasi *In Vitro* Hingga 16 dan 32 Sel terhadap Waktu Berbeda pada Berbagai Trial

Time	16 sel		32 sel	
	Mean ± SD		Mean ± SD	
20 jam	5.837 ^a ± 10.2571		1.344 ± 3.7334	
24 jam	18.624 ^b ± 17.3734		3.580 ± 7.8271	

^{a,b}Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Pengaruh interaksi antara perlakuan dan waktu untuk jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 16 sel tidak menunjukkan perbedaan

bermakna dengan nilai $p = 0,258$ ($p > 0,05$). Interaksi untuk jumlah oosit yang mengalami fertilisasi *in vitro* dan *cleavage* mencapai embrio 32 sel tidak signifikan ($p > 0,05$), namun didapatkan nilai probabilitas yang mendekati α ($p = 0,054$), oleh karena itu dilakukan uji HSD 5%.

Tabel 3. Hasil Uji Biologi Perkembangan Fertilisasi *In Vitro* Hingga 16 dan 32 Sel terhadap Perlakuan Kombinasi antara Trial dan Waktu

Trial	Time	16 sel		32 sel	
		Mean	SD	Mean	SD
<i>hMG</i> 1 µg/ml	20 jam	2.222 ^a ± 4.969		2.500 ^{ab} ± 5.590	
	24 jam	25.778 ^a ± 0.957		0.000 ^a ± 0.000	
<i>hMG</i> 4 µg/ml	20 jam	7.374 ^a ± 7.280		2.222 ^{ab} ± 4.969	
	24 jam	26.333 ^c ± 21.736		0.000 ^a ± 0.000	
<i>hMGdG</i> 1 µg/ml	20 jam	4.444 ^a ± 9.938		0.000 ^a ± 0.000	
	24 jam	15.556 ^a ± 14.907		4.444 ^{ab} ± 6.086	
<i>hMGdG</i> 4 µg/ml	20 jam	15.143 ^a ± 16.800		2.000 ^{ab} ± 4.472	
	24 jam	25.455 ^a ± 20.641		13.455 ^b ± 12.636	
<i>PMSG</i> 15 IU	20 jam	0.000 ^a ± 0.000		0.000 ^a ± 0.000	
	24 jam	0.000 ^a ± 0.000		0.000 ^a ± 0.000	

^{a,b}Superskrip berbeda pada kolom sama menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,05$).

Berdasarkan uji HSD 5% dapat diketahui bahwa terdapat kecenderungan perbedaan hasil yaitu jumlah oosit yang mencapai perkembangan embrio hingga 32 sel tertinggi didapat pada perlakuan kombinasi *hMGdG* 4 µg/ml-24 jam. Hasil yang sama didapatkan pada perlakuan kombinasi *hMG* 1 µg/ml-20 jam, *hMG* 4 µg/ml-20 jam, *hMGdG* 1 µg/ml-24 jam dan *hMGdG* 4 µg/ml-20 jam, sedang hasil terendah didapat pada perlakuan kombinasi *PMSG* 15 IU-20 jam dan 24 jam, *hMG* 1 µg/ml-24 jam, *hMG* 4 µg/ml-24 jam dan *hMGdG* 1 µg/ml-20 jam yang tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$) dengan perlakuan kombinasi lain kecuali *hMGdG* 4 µg/ml-24 jam.

Keberhasilan terbentuknya *cleavage* pada pembuahan *in vitro* tergantung kepada usaha maturasi oosit *in vitro* dan salah satu faktor yang berperan adalah dengan penambahan berbagai substansi pada media *in vitro*. Media biakan yang digunakan untuk maturasi oosit dan fertilisasi pada penelitian ini menggunakan medium kultur jaringan (TCM 199). Penambahan hormon gonadotropin pada medium *in vitro* akan meningkatkan persentase maturasi oosit dan tingkat perkembangan embrio setelah pembuahan *in vitro* (Trounson, 1977). Penambahan hormon yang dimaksud dalam penelitian ini adalah pemberian hormon gonadotropin *hMG* dan *hMG* terdeglisosilasi.

Fertilisasi merupakan proses penggabungan yang kompleks antara sel gamet jantan (spermatozoa) dan betina (oosit) sehingga jumlah kromosom kembali normal (diploid) dan dilanjutkan dengan pembelahan dan perkembangan membentuk individu baru. Keberhasilan fertilisasi *in vitro* pada sapi telah banyak dilaporkan namun masih belum diperoleh waktu yang tepat kapan sperma yang dikapasitasi mampu menembus sel kumulus dan zona pelusida dari oosit sampai tepat waktu kapan spermatozoa telah dipenuhi mampu menembus kumulus dan zona pelusida dari oosit sampai tepat waktu terjadi singami. Penetrasi spermatozoa terhadap oosit secara sempurna membutuhkan waktu 8 jam (Yuliani, 2000). Selama proses penembusan zona pelusida, kepala spermatozoa menembus ruang *perivitellin* menuju ke *vitellus* kemudian secara bertahap keduanya bergabung. Saat oosit telah masak dan mengalami luteinisasi oleh pengaruh LH, Ca^{2+} dalam *calcium wave* berperan untuk signaling respon spermatozoa saat fertilisasi (Cheung et al., 2000, Fleming, 2000). Setelah penetrasi melalui zona *pellucida* aktivasi spermatozoa akan mengakibatkan oosit melepaskan benda kutub II. Posisi pronukleus jantan dan betina yang berhadapan dipusat oosit merupakan prasyarat bagi pembentukan kromosom paternal dan maternal pada *spindle* pada pertama. Perpindahan kedua nukleus tergantung pada sitoskeleton. Duplikasi kromatin terjadi dalam kedua pronukleus secara bersamaan dan menjelang profase dari *cleavage* pertama. Komplemen kromatin paternal dan maternal mengalami kondensasi pada posisi berhadapan. Setelah menghilangnya membran kedua pronukleus, terjadi kombinasi kromosom paternal dan maternal membentuk sebuah inti baru yang diploid. Selanjutnya kromosom tertata pada bidang ekuatorial (*plate metaphase*) dari kutub *spindle* yang diorganisasi oleh sentromer dan mikrotubulus di daerah sitoplasma sekitarnya. Fertilisasi melibatkan proses aktivasi oosit oleh spermatozoa sehingga oosit mampu menyempurnakan pembentukan pronukleus betina dan setelah terjadi penggabungan (singami) antara pronukleus betina dengan pronukleus jantan akan membentuk sigot. Sigot sebagai hasil penggabungan pronukleus jantan dan betina selanjutnya akan diikuti pembelahan (*cleavage*) secara mitotik (Yuliani, 2000).

Acuan penggunaan hMG pada hewan secara *in vitro* belum pernah dipublikasikan, justru pada manusia atau perempuan penderita infertilitas, hMG masih memberikan efek terapi, bahkan hMG dapat dilibatkan langsung dalam proses IVF pada manusia (Daya et al., 1995). Jumlah oosit yang dikoleksi dan perkembangan embrio perempuan penderita infertilitas yang diteliti lebih baik bila diterapi dengan hMG dibandingkan dengan *recombinant human*

FSH (Hung et al., 2000). Penggunaan pada pasien yang diterapi dengan hMG dan dilanjutkan dengan proses *in vitro* maturasi dan fertilisasi 85% oosinya mencapai fase metafase (Agarwal et al., 2000; Imthurn et al., 1996; Mercan et al., 1997).

Pemberian hMG dibandingkan dengan hMGdG, perlakuan hMG 1 µg/ml 20 jam maturasi, selanjutnya kultur setelah 48 jam diperoleh perkembangan embrio $24,33 \pm 03,39$ sedangkan hMGdG 1 µg/ml angka *cleavage* meningkat $61,67 \pm 14,22$ (20 jam) hal ini karena proses pemutusan rantai karbohidrat yang terikat pada rantai karbon polipeptida dalam molekul *glycoprotein* hMG oleh enzim *glycanase*. Karbohidrat yang terkandung di dalam hMG meliputi gula monosakarida manosa, vultosa, asam sialat dalam bentuk *N-Acetyl-d-glucosamine* dan *alpha-d-Mannose* (Hara et al., 2007). Pemutusan manosa dan asam sialat, secara *in vitro* meningkatkan aktivitas FSH-LH dalam proses maturasi folikel, mempercepat terbentuknya *Germinal Vesicle Breakdown* (GVB) dan menumbuhkan sel granulosa serta *theca* (Bart et al., 1997; Wendy et al., 2001). Cara pemutusan molekul ini dilakukan secara non enzimatik dan enzimatik. Pemutusan secara non enzimatik dilakukan dengan pemberian *Trifluoro Methanesulfonic Acid* (TFMS) dan anisol. Secara enzimatik, pemutusan dilakukan dengan memberikan enzim *glycanase* (Yonezawa et al., 1999; Aulanni'am, 2003). Penambahan hormon pada media *in vitro* dengan konsentrasi yang bervariasi dengan hasil yang bervariasi pula. Goto dan Iritani (1992), telah menambahkan hormon 10 µg/ml LH; dan 10 µg/ml FSH dengan hasil 18,7% menjadi *Morulla* dan 17,4% menjadi *Blastula*. Martino et al. (1994), melakukan IVM dan pembuahan pada oosit kabin dengan penambahan, 10 µg/ml FSH dan 10 µg/ml LH, untuk mengevaluasi tingkat perkembangan inti pada akhir kultur, oosit dipisahkan dari sel kumulus kedalam PBS yang telah diberi 150 IU/ ml enzim *Hyaluronidase*. Hasil penelitian ini menunjukkan oosit mengalami maturasi pada metafase II sebanyak 75,9% sedang total oosit yang mengalami fertilisasi sebanyak 64,7%. Hasil yang sangat memuaskan telah dilaporkan bahwa maturasi oosit dalam medium TCM yang diberi FSH, LH dan Estrogen adalah 98% dengan tingkat fertilisasi mencapai 73%. Mahaputra dan Simomangkir (1999), mensubstitusikan gabungan hormon FSH, LH dan estrogen dengan kombinasi serum sapi birahi dan kuda birahi, angka *cleavage* hingga 69% pada oosit sapi. (Mercan et al., 1997), menggunakan hMG untuk tujuan *in vitro* maturasi dan *in vitro* fertilisasi menunjukkan angka 80% keberhasilan. Penelitian lain

setelah penambahan *hMG* dan dibandingkan dengan FSH secara terpisah pada media IVM dan dilanjutkan dengan IVF menunjukkan keberhasilan (**Weissman et al.**, 1999).

Human FSH mempunyai berat molekul sekitar 30 kDa dan LH 28,5–30 kDa. Struktur *hFSH* terdiri dari subunit α dan β . Sub unit α mempunyai 92 asam amino dan β 111 asam amino. Setiap Sub unit α dan β mempunyai dua ikatan karbohidrat. Dua ikatan karbohidrat ini berperan untuk mempertahankan waktu paruh (*half-life*) aktivitas biologi di dalam darah (**Motta et al.**, 1996; **Shoham**, 2007). Kandungan karbohidrat hormon FSH dan LH, 27,2% ada pada glikoprotein hormon ini, meliputi *N-Acetyl-d-glucoaminase (NAG)*, *alpha-d-mannosa* dengan perbandingan masing-masing adalah 1:1, sedangkan kadar asam sialat dan vuktosa bervariasi. Glikoprotein FSH terikat dari pada asam amino asparagin 52 dan 78, sedangkan LH pada asparagin 7 dan 24. Komposisi *outer layer* dari glikoprotein adalah monosakarida asam sialat dan *inner layer* adalah mannosa. Komposisi karbohidrat memungkinkan glikoprotein FSH larut dalam air karena sifat karbohidrat yang hidrofilik (**Hara et al.**, 2007; **Zara dan Naz**, 1998).

Telah diketahui bahwa *hMG* dan *hMGdG* merupakan FSH–LH *like*, FSH dalam aktivitasnya mempunyai reseptor yang jelas di sel granulosa yang berperan langsung pada perkembangan saat maturasi oosit (**Simoni et al.**, 1997). LH dalam aktivitasnya mempunyai reseptor di sel *theca* yang berperan langsung dalam proses *steroidogenesis* di kedua reseptor.

Proses deglikosilasi molekul *hMG* menjadi *hMGdG* berarti penghilangan atau pemutusan rantai karbohidrat yang terikat pada atom karbon polipeptida dalam molekul glikoprotein oligosakarida dan unsur karbohidrat lainnya, contohnya mannosa dan asam sialat, jika diputus rantai ikatan karbohidratnya akan mempercepat kerja FSH–LH secara *in vitro* dan akan lebih cepat menumbuhkan sel *theca* serta granulosa serta terbentuk *Germinal Vesicle Breakdown (GVB)* (**Bart et al.**, 1997; **Wendy et al.**, 2001), memungkinkan lebih cepat waktu terbentuknya *cleavage* secara *in vitro*. Waktu terbentuknya *cleavage* pada proses *in vitro* fertilisasi secara normal adalah 24 jam (**Mahaputra**, 2007). Pemutusan secara enzimatik digunakan enzim *glycanase* atau *endo-/exo-glycohydrolase* (**Aulanni'am**, 2003; **Yonezawa et al.**, 1999). **Anderson et al.** (2000) melaporkan hasil penelitian, penghilangan rantai penghubung antara gula mannose fuktose dan asam sialat pada cabang oligosakarida hormon gonadotrophin FSH–LH *like* (deglikosilasi) seperti pada *hMGdG*, secara *in vivo*, mempercepat aktivitas folikulogenesis hewan

dan memperpendek lama hidup dalam plasma darah. Hal yang sama, dilakukan secara *in vivo* pada manusia dengan menggunakan FSH deglikosilasi (**Zambrano et al.**, 2007). Di sisi lain, secara *in vitro*, FSH–LH *like* seperti pada *hMGdG* yang tidak mengandung hubungan antara gula manose, fuktose dan asam sialat dapat mempercepat induksi akumulasi cAMP yang sangat banyak dan produktif di perkembangan pronukleus diatur oleh faktor sitoplasmik dalam oosit yang disebut *Male Pronucleus Growth Factor* (MPGF) maturasi inti dan sitoplasma berpengaruh terhadap pembentukan pronukleus jantan dan betina untuk dapat berkembang sampai tahap blastosis **Yuliani** (2000). *hMGdG* bekerja secara seluler terjadi perubahan ATP menjadi cAMP dibawah pengaruh enzim adenil siklase yang langsung bekerja di sel granulosa pada FSH reseptor. FSH reseptor meningkatkan aktivin sehingga sel granulosa aktif menghasilkan hormon estrogen kemudian aktivitas reseptor FSH menurun dan inhibin yang dihasilkan oleh sel granulosa menghambat kerja FSH sehingga memicu sintesis androgen yang berdampak pada terbentuknya reseptor LH dalam sel *theca* mekanisme ini disebut sebagai *feed back loop* seperti yang terjadi pada proses FSH–LH *like* (**Roche**, 1996; **Aderson et al.**, 2000).

Merujuk pada bentuk *isoform* dari FSH–LH *like* seperti pada *hMGdG* berbagai bentuk tipe glikoprotein atau variasi formasi protein yang dikemukakan oleh **Shoham** (1995), bahwa *hMG* terdeglisosilasi telah mengalami perubahan bentuk dan terjadi pengurangan berat molekul menjadi < 26 kDa tidak mempengaruhi struktur dan berat proteinnya hanya terjadi perubahan berat molekul karbohidratnya terutama sasm sialat jika dikurangi aktivitasnya maka ada kecenderungan pH berubah menjadi basa sehingga aktivitasnya menjadi lebih cepat atau jika diberikan secara *invivo* dan *invitro* maka *half life*-nya menjadi lebih cepat (**Shoham**, 1995), mengatakan bahwa FSH *isoform* seperti pada *hMGdG* yang kehilangan aktivitas asam sialat dapat mempercepat pertumbuhan preantral folikel menjadi dominan folikel dengan cepat di samping itu terjadi akumulasi hormon estrogen begitu cepat oleh sel granulosa. **Bart et al.** memberikan definisi bahwa deglikosilasi (*deglycosilated*) glikoprotein khususnya FSH–LH *like* berarti hormon tersebut mengalami bentuk lain variasinya disebut sebagai *isoform*.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil telitian dan analisa data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu: Pemutusan ikatan glikan pada molekul FSH–LH *like* (*hMG*) dari urin perempuan pascamenopause menghasilkan *hMGdG* dapat

mempercepat waktu terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro*". Dari pokok simpulan umum tersebut, dapat ditarik beberapa sub simpulan sebagai berikut: *hMG* yang diperoleh dari urin perempuan pascamenopause di Indonesia yang mengandung glikoprotein dengan berat molekul 30 kDa; Karakter biokimiawi *hMG* hasil deglikosilasi secara enzimatis dengan menggunakan enzim *N-glicanase* menjadi *hMGdG* terjadi penurunan berat molekul di antara 26–17 kDa; dan Induksi *hMGdG* dapat mempercepat waktu terbentuknya *cleavage* embrio sapi secara *in vitro* dari 24 jam menjadi 20 jam.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal R, Holmes J and Jacobs HS**, 2000. Follicle-stimulating hormone or human menopausal gonadotrophin for ovarian stimulation in vitro fertilization cycles: a meta analysis. *Fertil. Steril.*, 73: 338–343.
- Aguirre AU, Timossi C, Tomasi JB, Maldonado A and Nayudu P**, 2003. Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function of Follicle- Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and in Vivo Models. Research Unit in Reproductive Medicine, Hospital de Ginecobstetricia Luis Castelazo Ayala, IMSS, Mexico DF Gamete Biology Laboratory, Departement of Reproductive Biology. German Primate Centre, Gotingen Gemany. *Bio. Reprod.* 69: 379–389.
- Alcivar AA, Maurer RR and Anderson LL**, 1992. Endocrine changes in beef heifers superovulated with follicle stimulating hormone (FSH.P) or human menopausal gonadotrophin. Department of Animal Science Iowa State University and Roman Lhruskaus. Dept. of Agriculture Clay Center. *J. Anim Sci.* 70: 224–231.
- Anderson CY, Leonardsen L, Ulloa-Aguirre A, Barrios-De-Tomasi J, Kristensen KS and Byskov AG**, 2000. Effect of different FSH isoform on cyclic-AMP production by mouse cumulus-oocyte-complexes: a time course study. Laboratory of Reproductive Biology, Section 5712, Juliane Marie Center for Children, Women and Reproduction, University Hospital of Compenhagen.
- Aulanni'am**, 2003. Analisis antibodi hasil induksi bovine zona pellusida-3 terdeglisosilasi (bZP3dG) untuk pengembangan vaksin kontrasepsi. Desertasi, Program Pascasarjana. Universitas Airlangga, Surabaya. 3–150.
- Aulanni'am**, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolecular. Laboratorium Biomolecular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang.
- Bart CJ, Fautser M, and Arne MVH**, 1997. Manipulation of human ovarian function physiologycal concepts and clinical consequences. Divicion of Reproductive Medicine. Dept of Obstetric Gynecology. Erasmus Univ. Medical School. *Endocr. Rev.* 18: 71–106.
- Cheung A, Swann K, and Carrol J**, 2000. The ability to generate normal Ca²⁺ transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocytes growth and maturation. *Hum Reprod.* 15. 1389–95.
- Daya S, Gunby J, and Hughes J**, 1995. Follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization cycles: a meta-analysis. *Fertil. Steril.* 64: 347–354.
- Daya S and Gunby J**, 1999. Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Hum. Reprod.* 14: 2207–2215.
- Eppig JJ, Wigglesworth K and Pendola FL**, 2002. The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME 04609. University of Missouri. Columbia.
- Fleming R, Archaya U and Kennedy**, 2000. In Vitro Maturation of Oocytes. Response to the Human Fertilisation and Embryology Authority Working Group on New Developments in Reproductive Technology. Prepared By Policy and Practice Sub Committee of the BFS.
- Goto K and Iritani A**, 1992. Oocyte maturation and fertilization. *Anim. Elsevier Science Publisher B.V*; Amsterdam. *Reprod. Sci.* 28: 407–413.
- Hara K, Premila A, Rantham and Saxena B**, 2007. Structure of the Carbohydrate Moeities of Alfa Subunit of Human Follitrophin, Lutrophin and Thyrotrophin. Division of Endrocynology. Department Medicine Cornell University.
- Hermadi HA**, 2001. Uji potensi biologis anti bodi poliklonal anti inhibin pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tesis, Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya. 42–50.
- Huang FJ, Chung KL, Tsai FK, Yin MT, Yang CC, Wei HH, Chi YL and Chang SY**, 2004. Human cumulus-free oocyte maturational profile and in vitro

- developmental after stimulation with recombinant versus urinary FSH. Dept of Obstetrics and Gynecology Chang Gung Memorial Hospital Taiwan. Hum. Reprod. 19: 306–315.
- Hung YngE, Estella YLL, William SBY and Ho PC**, 2000. hMG is as good as recombinant human FSH in term of oocyte and embryo quality: A Prospective Randomized Trial. Dept. of Obstetrics and Gynecology, Quen Mary Hospital, the University of Hongkong.
- Imthurn B, Macas E, and Rosselli M**, 1996. Nuclear maturity and oocyte morphology after stimulation with highly purified follicle stimulating hormone compared to human menopausal gonadotrophin. Hum. Reprod. 11: 2387–2391.
- Jacob S, Drudy L and Conroy R**, 1998. Outcome from consecutive in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone. Hum. Reprod. 13: 1783–1787.
- Koninckx PR**, 2001. Meta analysis of recombinant and urinary FSH. Dept. of Obstetric Gynaecology Univ. Hospital Gasthuisberg Lauven Belgium. Hum. Reprod. 16(1): 196–197.
- Kubo H**, 2005. A systematic review of controlled ovarian stimulation (COS) with recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) versus urinary gonadotrophin in GnRh protocols for pituitary desensitization in assisted reproduction cycles. J. Mamm. Ova. Res. 22: 2–12.
- Lunenfeld B**, 2004. Historical perspective in gonadotrophins therapy. Faculty of Life Science Barhan University Ramat gan 52900. Israel. Human Reprod. 1–31.
- Mahaputra L, Ernawati R dan Simomangkir D**, 1999. Pembuatan embryo jantan dan betina secara terpisah serta pengembangan cell line sebagai pemicu pertumbuhan dengan pengetahuan tehnik bayi tabung pada sapi, Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/I. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.
- Mahaputra L dan Simomangkir D**, 1999. Supplement for in vitro maturation and fertilization of bovine eggs; a comparison and estrogen, estrus mare serum and estrus cow serum. Folia Medica Indonesiana. Airlangga University School of Medicine. Vol. 35.
- Mahaputra L**, 2007. Bioaktivitas berbagai serum kuda sebagai substitusi aditif FSH, estrogen dan LH saat maturasi oosit dalam teknik bayi tabung pada sapi. Jurnal Biosains, Pascasarjana Unair. 9: 29–24.
- Martino A, T. Mogas, Paloma MJ and MT. Paramio**, 1994. In Vitro Maturation and Fertilization of Prepubertal Goat Oocytes. Theriogenology. (43): 473–485.
- Mercan R, Mayer JF and Walker D**, 1997. Improved oocyte is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/human menopausal gonadotrophin combination. Hum. Reprod. 12: 1886–1889.
- Molecular Station**, 2006. Western Blot. <http://www.molecularsite>.
- Motta M, Zanisi M and Piva F**, 1996. Pituitary Hormones and Related Peptides. Academic Press Inc., New York, Scripps News, A publication of Scripps Laboratories, Inc. Vol. 10.
- Picton HM, Harris SE, Muruvi W and Chambers EL**, 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction and Early Development Research Group, The light Laboratories, Leeds Institute of Genetics, Health and therapeutic, University of leeds, clarendon Way. Reproduction 136. 703–715.
- Ratnani H dan Hermadi HA**, 1992. Pengaruh hMG pergonal serono terhadap birahi dan kebuntingan pada kambing. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.
- Roche FJ**, 1996. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. Department of Animal Husbandry and Production, Faculty of Veterinary Medicine, University College, Dublin 4, Ireland. Reviews of Reprod. 1: 19–27.
- Shoham Z**, 2007. Clinical Experience with Recombinant Human FSH. Department of Obstetrics and Gynecology, Kaplan Hospital, Rehovot, Israel
- Simoni M, Gromoll J and Chlase N**, 1997. The follicle stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. Institute of Reproductive Medicine of the University Domagkstrabe 11, D-48129. Muster Endocrine Reviews. 18: 739–773.
- Sirard MA and Lambert RD**, 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocyte obtain by laparoscopy. Biol. Reprod. 33: 905–918.
- Steel RGD dan Torrie JH**, 1995. Prinsip dan Prosedure Statistika Jakarta. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Jakarta.

- Trounson AO, Willadsen SW and Rowson LEA**, 1977. Fertilization and developmental capacities of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviduct of rabbits and cows. *J. Reprod. Fertil.* 51: 321.
- Weissman A, Meriono J and Ward S**, 1999. Intracytoplasmic sperm injection after follicle stimulation with highly purified human follicle-stimulating hormone compared with human menopausal gonadotrophin. *J. Assist. Reprod. Genet.* 16: 63–68.
- Wendy J, Walton, Nguyen Van T, Vladimir YB, Vinod Sigh, William T, Moore and George RB**, 2001. Characterization of human FSH isoporm reveals a non glycosylated β sub unit in addition to the conventional glycosylated β sub unit. Dept. of Biological Science Wichita State University Kansas. *J. of Clin. Endocrinol. and Metabolism.* 86: 3765–3685.
- Yonezawa N, Fukui N, Kudo K and Nakano M**, 1999. Localization of neutral N-linked carbohydrate chains in pig zona pellucida glycoprotein ZPC. *Eur. J. Biochem.* 260: 57–63.
- Yuliani E**, 2000. Pemisahan spermatozoa dengan metode swim up dan kombinasi swim up dengan asid migration pengaruhnya terhadap rasio kromosom sex. Disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Zambrano E, Olivares A, Mendez JP, Guerrero L, Diaz-Cueto L, Veldhuis JD and Ulloa-Aguirre A**, 2007. Dynamics of basal and gonadotrophin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isoform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. of Clin. Endocrinol. and Metabolism.* 80: 1647–1654.
- Zara J and Naz RK**, 1998. The role of carbohydrate in mammalian sperm egg interaction: How important are carbohydrate epitopes? *Front Biosci.* 15: 1028–1038.