

ISOLASI, IDENTIFIKASI DAN PEMURNIAN *human*
MENOPAUSE GONADOTROPIN (hMG) DARI PEREMPUAN
MENOPAUSE UNTUK MEMANIPULASI PERTUMBUHAN
FOLIKEL DAN *IN VITRO* MATURASI PADA SAPI PERAH

ISOLATION, IDENTIFICATION AND PURIFICATION OF PROTEIN *human*
MENOPAUSE GONADOTROPIN (hMG) FROM WOMEN MENOPAUSE FOR
FOLLICLE GROWTH AND *IN VITRO* MATURATION IN DAIRY CATTLE

Herry Agoes Hermadi⁽¹⁾, Wurlina⁽¹⁾ and Mas'ud Hariadi⁽¹⁾

ABSTRACT

The second phase of the research was aimed to determine the character of anti hMG. The characterization of anti – hMG was carried out through evaluation of specific reaction by using Indirect ELISA method.

Booster injection was required order to increase titer anti – hMG, this injection was 100 µg or 2 ml protein of hMG in 0.2 ml Incomplete Freund Adjuvant (IFA). The optical density (OD) from ELISA with 1 : 10 dilution rate is described in the tables of attachment 3. As can be seen from those tables that optical density (OD) of antibody against hCG increased from 1st week (0.576) to 3rd week (2.952) after first booster. In the 4th week the OD started to decline (1.971), and reaching the lowest point at 5th week (1.132). So, the second booster was performed in the fifth week, the OD then increased gradually in 6th week (2.148) and reaching the highest point at 7th week (3.177) and then started to decline again, the OD in the 8th, 9th and 10th were 3.070, 2.267 and 1.220 respectively. The production of anti hMG that was induced by hMG resulting from electroelution and measured by ELISA technique have shown that hMG from isolation of urine menopausal woman was capable to induce anti hMG.

In conclusion, the result of characterization of hMG molecule protein from urine menopause woman with molecular weight at 30 kDA has potentially immunogenic activity which capable of inducing humoral antibody against hMG (anti hMG).

Keywords : Anti-hMG, indirect ELISA

PENDAHULUAN

Kondisi populasi ternak sapi secara Nasional menurun 1,22% per tahun, kondisi ini disebabkan kebutuhan daging sapi yang tinggi. Kebutuhan protein asal hewan secara Nasional 6 gram/kapita/hari, namun baru tercapai 5,34 gram/kapita/hari. Disamping itu pemanfaatan teknologi inseminasi buatan, embrio transfer belum maksimal hasilnya dan sering

terjadi gangguan reproduksi pada ternak (Ditjenak, 2006).

Salah satu gangguan reproduksi yang disebabkan oleh faktor hormonal sering terjadi pada sapi dapat mengganggu proses maturasi, fertilisasi sel telur dan perkembangan embrio. Prioritas penanggulangan gangguan keseimbangan hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH) yang rendah

⁽¹⁾ Bagian Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

pada hipofungsi ovarium adalah membenahi penyebab utamanya seperti, faktor manajemen, ransum pakan sapi yang cukup dengan kualitas yang baik dan seimbang, diharapkan *Body Score Condition* (BSC) telah mencapai nilai lebih dari dua, dilanjutkan dengan pemberian kombinasi FSH-LH atau FSH-LH like. Preparat FSH-LH like yang dimaksud sebagai contoh adalah *Pregnant Mare Serum Gonadotrophin* (PMSG) dan *human Menopause Gonadotrophin* (hMG) (Alcivar *et al.*, 1992; Hadley, 1992; Harjopranto, 1995; Roche, 1996).

Kebutuhan hormon *gonadotrophin* 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 pendahuluan dengan menggunakan hMG untuk induksi birahi dan kebuntingan pada ternak kambing pertama dilakukan di universitas airangga menunjukkan hasil yang cukup baik (Ratnani dan hermadi, 1992). Sampai akhir tahun 1995, kebutuhan dunia akan hormon *gonadotrophin* yang berasal dari urin perempuan menopause dipenuhi dari China, India, Eropa dan Amerika Latin untuk pabrik hMG (*Menotropin*) di USA. Konsumen hMG pun terbatas pada kesehatan reproduksi manusia dan tidak pada hewan (Lunenfeld, 2004).

hMG yang dihasilkan dari urin perempuan menopause memberikan efek terapi yang baik dan relevan pada perempuan resipien atau penderita infertil, bahkan setelah terapi hMG dapat dilanjutkan langsung dalam proses *In Vitro Maturasi* (IVM) dan *In Vitro Fertilisasi* (IVF) pada manusia (Daya *et al.*, 1995; Kubo, 2005). Terapi dengan hMG menghasilkan 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* (Agarwal *et al.*, 2000; Imthurn, *et al.* 1996; Mercan *et al.*, 1997). hMG efektif untuk terapi infertilitas maupun perlakuan sebelum IVF untuk merangsang proses maturasi folikel, ovulasi dan respon ovarium, serta pertumbuhan embrio yang dihasilkan disamping harganya yang jauh lebih murah (Huang *et al.*, 2004; Koninckx, 2001; Westergaard *et al.*, 1996). Pada hewan ternak, hMG mempunyai peluang untuk dikembangkan karena sumbernya yang mudah diperoleh (Alcivar *et al.*, 1992).

Selaras dengan kemajuan bioteknologi dibidang peternakan di Indonesia khususnya embrio transfer dalam rangkai peningkatan populasi ternak sapi bank embrio di UPT Cipelang sedang digalakkan. Hormon FSH - LH sangat dibutuhkan keberadaanya untuk proses produksi embrio secara *in vitro*. hMG terdiri dari kombinasi hormon FSH dan LH. Reseptor FSH di ovarium ada pada 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* (Khas and Menon, 1998). Maturasi sel telur di luar tubuh (IVM) tidak akan berhasil dengan sempurna apabila tidak diciptakan kondisi yang serupa dengan di dalam tubuh induknya (*In Vivo*). Maturasi oosit maupun pertumbuhan embrio secara *In Vitro* diperlukan medium yang berfungsi sebagai tempat persediaan nutrisi dan sekaligus tempat pembuangan metabolit nutrisi. Zat-zat ada dalam medium merupakan zat - zat yang terlarut contohnya gula, asam amino dan ion organik yang diperlukan untuk metabolisme sel (Mahaputra dkk., 1999). Pada proses IVM dibutuhkan pula penambahan hormon FSH dan LH. Sebelum dilakukan IVM dan IVF pada

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

Molekul protein FSH – LH like seperti hMG dengan BM 30 kDA merupakan antigen yang poten. Menurut Baratawijaya (2004) immunogen poten adalah protein besar dengan BM lebih dari 10.000 Dalton, mempunyai banyak macam determinan dan univalen. Selanjutnya isolat protein hMG dipakai untuk imunisasi kelinci dalam produksi antibodi hMG.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut : Bagaimana karakter Anti-hMG melalui uji spesifitas reaksi menggunakan metode *indirect* ELISA?

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui karakter Anti-hMG melalui uji spesifitas reaksi menggunakan metode *indirect* ELISA. Manfaat Penelitian diperoleh data karakter Anti-hMG melalui uji spesifitas reaksi menggunakan metode *Indirect* ELISA.

METODE PENELITIAN

Pemecahkan masalah dalam penelitian ini dibuat kerangka umum yang nantinya akan dijabarkan kedalam metode yang lebih khusus dan terperinci. Pada garis besarnya penelitian ini dilakukan secara bertahap adalah sebagai berikut.

Pada penelitian ke II digunakan kelinci lokal jantan yang sehat telah melewati usia pubertas, berat badan 1,5 – 2 kg. Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian kedua adalah isolat hMG yang diperoleh dari hasil ekstraksi urin perempuan

menopause setelah melalui karakterisasi dan isolasi dengan teknik SDS-PAGE dan Elusi. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) produksi SIGMA Chemical Company USA, *phosphate buffer saline* (PBS) pH 7, skim milk, tween 20 (*polyoxyethylen sorbitan monolaurat*, Art, 822184, Merck Schuchardt, Munchen), PMSF, etanol absolut, buffer Tris-HCL, NaN₃(Sodium Azide), substrat Western Blue (Western Blue Stabilized Substrate for alkaline phosphatase cat # S 3841, Promega Corporation, (USA), Anti IgG Rabbit AP (Anti Rabbit IgG C (Fc), AP Conjugate, Catalog # S 3731, Promega Corporation-USA), membran nitroselulose (Hybond-C pure, nitrocellulose membrane, Amersham Life Science-England), kertas tissue, carbonate-bicarbonate, BSA (Bovine Serum Albumin), MgCl₂, NaOH, TBS (Tris Buffer Saline), Glutaraldehyde 0,25%, TCM (Tissue Culture Medium) Sedangkan peralatan yang digunakan adalah microplate, Elisa reader, vacuum pump, vortex, gunting, pipet eppendorf, pipet Pasteur, plastik tip, cawan petri, gunting, kantong selofan, sentrifus, tabung reaksi, magnetic stirrer, incubator CO₂, refrigerated centrifuge, freezer, autoclaf, peralatan gelas, peralatan seksi, vaccutainer.

Metode Imunisasi Kelinci Dengan Isolat Protein hMG

Sebanyak 6 ekor kelinci jantan strain *New Zealand* disuntik secara subkutan dengan 150 µl isolat hMG dalam *Freund's complete adjuvant*. Penyuntikan ulang pertama dilakukan 4 minggu setelah penyuntikan pertama dengan 10 µg isolat hMG dalam *Freund's incomplete adjuvant*. Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke 1-10 setelah penyuntikan ulang pertama. Penyuntikan ulang kedua dilakukan pada minggu ke lima setelah penyuntikan ulang pertama. Darah diambil pada masing-masing kelinci sebanyak 5 cc melalui *vena auricularis* untuk dianalisa titer antibodi hMG dengan menggunakan *indirect* ELISA.

Metode Purifikasi Antibodi hMG Dengan Saturated Ammonium Sulphate (SAS)

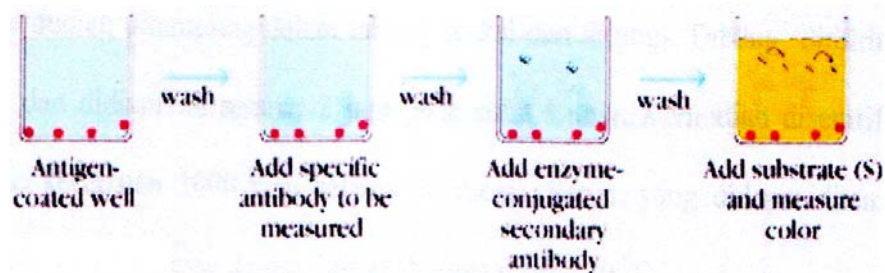
Jernihkan cairan serum antibodi hMG dari kontaminan lainnya dengan jalan sentrifugasi pada 17.000 g selama 15 menit, 4° C. Ambil supernatan yang jernih dan biarkan di dalam es. Tambahkan pelan-pelan dengan volume yang sama amonium sulfat jenuh, biarkan pada 4° C selama 2 jam. Pindahkan cairan tadi ke dalam tabung sentrifus dan putar pada 1000 rpm, 10 menit, 4° C. Pelet dari endapan yang didapat dicuci 2 kali dengan 50% amonium sulfat dingin.

Pencucian dapat dilakukan dengan melarutkan pelet tadi ke dalam air dan selanjutnya diulangi presipitasi dengan 50% amonium sulfat. Pelet dilarutkan dalam aquades dengan 1/10 volume cairan semula. Pindahkan larutan tersebut ke dalam tabung dialisis yang sudah dipersiapkan dan dialisa terhadap PBS pada 4° C dengan 2 kali pergantian volume. Sentrifus dan

pisahkan presipitat, aliquot dalam volume kecil dan disimpan pada -70° C (Aulani'am, 2005).

Metode Pengukuran Optical Density (OD) Antibodi hMG Dengan Indirect ELISA

Microplate 96 well dilapisi dengan isolat hMG sebanyak 100 µl, kemudian diinkubasi pada 4° C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan diblok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1%, kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali. Setelah itu direaksikan dengan antibodi hMG sebanyak 100 µl dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi konjugate alkaline fosfatase dan diinkubasi pada 37° C selama 1 jam kemudian dicuci. Setelah itu ditambahkan substrat PNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan.

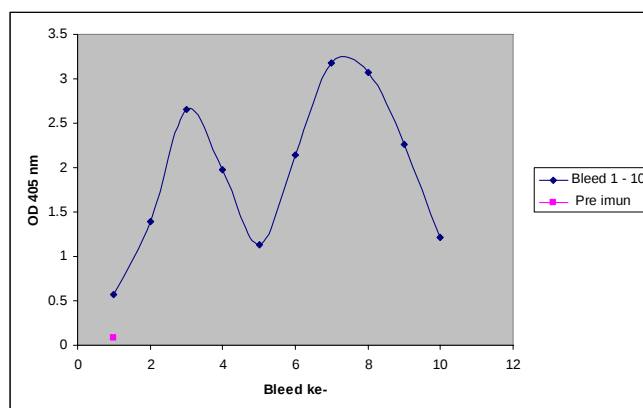


Gambar 1. Bagan Prosedur *Indirect* ELISA dengan hasil warna kekuningan (Berg *et. al*, 2002).

Hasil OD dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm (Rantam, 2003). Hasil OD dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD pada panjang gelombang 405 nm (Rantam, 2003). Prosedur *indirect* ELISA dapat dilihat pada Gambar 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi isasi anti-hMG dengan metode ELISA. Produksi anti-hMG dilakukan dengan induksi hMG hasil elektroelusi. Bukti imunogenesitas dibuktikan dengan penghitungan titer ELISA seperti pada Gambar 2 dan Tabel 1.



Gambar 2. Profil Titer anti hMG

Keterangan:

bleed ke : Pengambilan serum ke -

Tabel 1. Hasil OD anti – hMG

Bleed ke -	OD			bleed ke	OD	
	OD1	OD2	Rata-rata		OD	P1
pi	0.089	0.089	0.089	0		
B1	0.096	1.056	0.576	1	0.010	0.089
B2	1.234	1.556	1.395	2	0.038	
B3	2.803	3.1	2.952	3	0.093	
B4	2.021	1.92	1.971	4	0.059	
B5	1.115	1.148	1.132	5	0.029	
B6	2.315	1.981	2.148	6	0.065	
B7	3.18	3.173	3.177	7	0.101	
B8	3.288	2.851	3.070	8	0.097	
B9	2.106	2.428	2.267	9	0.069	
B10	1.117	1.323	1.220	10	0.032	

Gambar 2, menunjukkan bahwa hMG hasil isolasi mampu menginduksi anti-hMG, dimana sampai pada bleed 10 hMG hasil penelitian ini mampu memproduksi anti-hMG, meskipun titer tertinggi ada di bleed ke-7.

Hasil pada Gambar 2, menunjukkan bahwa antibodi-hMG hasil penelitian ini merupakan respon induksi hMG hasil elektroelusi, bersifat spesifik dengan hMG yang terkandung dalam urin perempuan menopause.

Penentuan Titer anti-hMG

Karakter anti-hMG hasil induksi hMG (30 kDa) hMG hasil penelitian dalam menginduksi terbentuknya anti-hMG, maka hMG yang digunakan adalah produk hasil elektroelusi pada gel Native PAGE BM 30 kDa Sebanyak

1 ml isolat protein hMG (mengandung 66939,29 µg/ml protein hMG) diencerkan dengan PBS sampai volume 10 ml, 0,3 ml larutan (mengandung 150 µg protein hMG) digunakan untuk imunisasi hewan coba kelinci yang diinduksi oleh hMG hasil elektroelusi menghasilkan anti-hMG yang profil seperti pada kelinci. 0,3 ml larutan tersebut dicampur dengan 0,3 ml *Complete Freund Adjuvant* (CFA). *Complete Freund Adjuvant* merupakan *adjuvant* yang mengandung minyak pengemulsi dan mikobakteria sehingga bersifat sebagai *adjuvant* yang kuat dalam merangsang respon antibodi dalam waktu lama dengan jalan membebaskan tetes-tetes emulsi pelan-pelan dan merangsang fungsi makrofag (Baratawidjaja, 2004).

Karakter anti-*hMG* hasil induksi *hMG* (30 kDa) *hMG* hasil penelitian dalam menginduksi terbentuknya anti-*hMG*, maka *hMG* yang digunakan adalah produk hasil elektroelusi pada gel Native PAGE BM 30 kDa Sebanyak 1 ml isolat protein *hMG* (mengandung 66939,29 µg/ml protein *hMG*) diencerkan dengan PBS sampai volume 10 ml, 0,3 ml larutan (mengandung 150 µg protein *hMG*) digunakan untuk imunisasi hewan coba kelinci yang diinduksi oleh *hMG* hasil elektroelusi menghasilkan anti-*hMG* yang profil seperti pada kelinci. 0,3 ml larutan tersebut dicampur dengan 0,3 ml *Complete Freund Adjuvant* (CFA). *Complete Freund Adjuvant* merupakan *adjuvant* yang mengandung minyak pengemulsi dan mikobakteria sehingga bersifat sebagai *adjuvant* yang kuat dalam merangsang respon antibodi dalam waktu lama dengan jalan membebaskan tetes-tetes emulsi pelan-pelan dan merangsang fungsi makrofag (Baratawidjaja, 2004).

Injeksi *booster* dibutuhkan untuk mendapatkan serum dengan titer dan afiditas paling tinggi. Sebanyak 100 µg (0,2 ml) protein *hMG* dalam 0,2 ml *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) digunakan untuk injeksi *booster*. *Booster* diberikan setelah respon imun pertama mencapai puncak dengan waktu paling sedikit 4 minggu dari injeksi pertama. *Booster* berikutnya diberikan dengan interval 3-6 minggu tergantung pada kekuatan responnya. Dosis *booster* dibuat lebih kecil dari dosis pertama dalam IFA untuk menghindari terjadinya reaksi hipersensitivitas (Baratawijaya, 2004).

Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi. Imunisasi kelinci dengan isolat protein *hMG* akan memberikan respon dengan terbentuknya antibodi *hMG*. Induksi antibodi *hMG* diduga melalui respon imun humoral. Respon imun spesifik terbagi atas respon imun humoral dan

respon imun seluler. Respon imun humoral adalah respon terhadap imunogen ditandai dengan dihasilkan-nya antibodi terlarut.

Mekanisme terbentuknya antibodi *hMG* dapat dijelaskan sebagai berikut, protein *hMG* masuk ke dalam tubuh akan diproses dalam *Antigen Presenting Cell* (APC) dan dipresentasikan ke reseptor pada sel Tc dan Th yang masing-masing berhubungan dengan *Major Histocompatibility Complex* kelas I dan II (MHC I dan II). APC memproduksi dan melepas sitokin (IL-1) yang merangsang sel T untuk berproliferasi dan berdeferensiasi.

Aktivasi sel T oleh protein *hMG* menghasilkan sel T memori yang dapat memberikan respon sekunder terhadap antigen yang sama. Setelah dirangsang sel T memori akan memproduksi sitokin (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 IFN γ dan GM-CSF). Aktivasi berulang dari sel T memori mengakibatkan deferensiasi sel Th menjadi sel T yang memproduksi sitokin yang terbatas, Th1 dan Th2. Sel Th1 memproduksi sitokin seperti IFN γ , IL-2, TNF, sedangkan sel Th2 memproduksi sitokin seperti IL-3, IL-4, IL-5 dan IL-10. Sel Th1 lebih berperan pada reaksi seluler sedangkan sel Th2 lebih berperan pada reaksi humoral.

Sel Th yang dirangsang melepas sitokin yang mengaktifkan sel B dalam 3 tingkat yaitu aktivasi, proliferasi dan deferensiasi menjadi sel plasma yang memproduksi Ig. IL-1 dikenal sebagai *B Cell Differentiation Factor* (BCDF) dan IL-5 sebagai *B Cell Growth Factor* (BCGF). BCDF yang dilepas sel T merangsang sel B yang sudah mengikat protein *hMG* dan membelah diri menjadi sel plasma yang mampu memproduksi antibodi *hMG*. Sedangkan BCGF merangsang sel B yang sudah mengikat protein *hMG* untuk berproliferasi. Hasil menunjukkan bahwa antibodi-*hMG* hasil penelitian ini, yang merupakan respon induksi *hMG* hasil elektroelusi bersifat spesifik dengan *hMG* yang

terkandung dalam urin perempuan menopause.

Hasil pengukuran absorbansi dengan ELISA pada pengenceran 1 : 10 diperoleh nilai *optical density* (OD) antibodi hMG dan rataannya seperti tertera pada lampiran 3 dan tabel Lampiran. Dari tabel tersebut menunjukkan bahwa OD antibodi hMG terjadi peningkatan dari minggu pertama (0,576) sampai minggu ke 3 (2.952) setelah *booster* pertama. Pada minggu ke 4 (1.971) mulai terjadi penurunan dan mencapai angka terendah pada minggu ke 5 (1.132). Pada minggu ke 5 dilakukan *booster* ke 2, setelah *booster* ini diikuti peningkatan OD kembali sampai minggu ke 6 (2.148) minggu ke 7 (3.177) yang tertinggi dan mulai menurun kembali pada minggu ke 8 (3.070) minggu ke 9 (2.267) dan 10 (1.220).

Menurut Sousa *et al.* (2006) yang mengatakan bahwa hMG termasuk dalam golongan *aspartic proteinase* dengan kandungan asam amino lebih dari 50% identik dengan pepsin, cathepsin D dan cathepsin E. Protein hMG dalam penelitian ini terbukti mampu menginduksi terbentuknya antibodi hMG sehingga dapat dikatakan sebagai antigen atau imunogen.

Sesuai dengan pendapat Clancy (1998) yang menyatakan bahwa minggu pertama dan kedua setelah penyuntikan antigen maka konsentrasi IgG dalam serum mulai meningkat dan kemudian akan meningkat lebih tajam pada minggu ketiga setelah *booster*. Titer antibodi hMG yang terukur menunjukkan respon imun akibat paparan dengan protein hMG. Hal ini menunjukkan. Titer antibodi hMG semakin tinggi setelah *booster* kedua karena semakin kuat respon imunnya. Sesuai dengan teori imunisasi (Clancy, 1998) yang menyatakan bahwa pemberian antigen untuk pertama kali pada imunisasi akan menginduksi respon antibodi yang dapat diukur dalam serum setelah periode sekitar 6-12 hari. Paparan yang sama untuk kedua

kali pada pemberian *booster* akan menginduksi respon antibodi sekunder dalam serum yang dapat diukur dalam beberapa hari setelah *booster*. Titer antibodi dalam serum tetap tinggi dalam waktu lama, yaitu beberapa minggu sampai beberapa bulan setelah imunisasi serta mempunyai afinitas tinggi terhadap antigen (Ada, 2001).

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data yang dilakukan dapat dibuat kesimpulan umum yaitu : hasil karakterisasi molekul protein hMG hasil isolasi yang berasal dari urin perempuan menopause dengan BM 30 kDA merupakan imunogen yang poten atau bersifat imunogenik karena dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti - hMG.

Berdasarkan kesimpulan umum dapat ditarik subkesimpulan adalah hMG hasil isolasi mampu menginduksi anti-hMG, dimana sampai pada bleed 10. hMG hasil isolasi mampu menginduksi anti-hMG, pada bleed ke 7 mempunyai OD yang tertinggi.

Saran

Hasil karakterisasi molekul protein hMG hasil isolasi yang berasal dari urin perempuan menopause dengan BM 30 kDA merupakan antigen yang poten atau bersifat imunogenik karena dapat menginduksi respon imun humoral dengan terbentuknya anti - hMG perlu dipertimbangkan pada saat penggunaan untuk terapi reproduksi pada sapi karena adanya anti - hMG akan mengurangi potensi biologisnya pada terapi berikutnya pada sapi penderita yang sama. Sebagai saran perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang aplikasi hMG pada ternak khususnya sapi perah baik secara *in vitro* maupun *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Ada G.2001. *Vaccines and Vaccination*. New Engl J Med. 345: 1042 – 1053
- Agarwal, R. Holmes, J. and H.S. Jacobs. 2000. *Follicle-Stimulating Hormone or human Menopausal Gonadotrophin for Ovarian Stimulation in in Vitro Fertilization Cycles : a metaanalysis*. *Fertil. Steril.*, 73, 338-343.
- Alcivar, A.A; R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984a. *Superovulatory Responses in FSH or Pergonal-Treated Heifers*. *Theriogenology* 22:635.
- Alcivar, A.A; R.R Maurer, and L.L Anderson. 1984b. *Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone, Progesterone and Estradiol-17B in Superovulated Beef Heifers*. In: *Proc. 10 th Int. Cong. Anim. Reprod. And AI*, Vol. 3. 303
- Alcivar, A.A; R.R Maurer and L.L Anderson. 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.
- Aulanni'am. 2003. *Analisis Antibodi Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida-3 Terdeglikosilasi (bZP3dG) Untuk Pengembangan Vaksin Kontrasepsi*. Penelitian Experimental Laboratoris. Desertasi Program Pasca Sarjana. Universitas Airlangga Surabaya. 3-150.
- Aulanni'am. 2004. *Prinsip dan Tehnik Analisis Biomolecular*. Laboratorium Biomolecular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang
- Aulani'am. 2005. *Protein & Analisisnya*. Penerbit Citra Mentari Group, Malang.
- Aulanni'am. 2005. *Protein dan Analisisnya*. Laboratorium Biomolecular FMIPA. Universitas Brawijaya. Penerbit Citra Mentari Group. Malang.
- Austyn J, M. and K.J. Wood. 1993. *Principle of Cellular and Molecular*.
- Baratawidjaja K.G. 1996. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 68-72.
- Baratawidjaja K.G. 2004. *Imunologi Dasar*. Edisi keenam. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. Hal 51-70.
- Baratawidjaja, K.G. 2006. *Imunologi Dasar*. Edisi ketujuh. Cetakan ke-1. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Gaya Baru. Jakarta.
- Berg, J.M, J.L. Tymoczko and L. stryer. 2002. *Biochemistry*. 5th edition. W. H. Freeman and Company. .
- Clancy J. 1998. *Basic Concept in Immunology : A Student's Survival Guide*. Th McGraw-Hill Co New York.p.91-99.
- Daya, S., Gunby and J., Hughes. 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.
- Direktur Jendral Peternakan. 2006. *Produksi Daging, Telur dan Susu*.http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/nak/isi_infoekse_nak.htm.
- Goto, K and Iritani, A. 1992. *Oocyte Maturation and Fertilization*. *Anim Reprod Sci* (28) : 407 – 413. Elsevier Science Publisher B.V; Amsterdam.
- Hadley, M.E., 1992. *Endocrinology*. Third Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey 07632.
- Hardjopranjoto, S., 1995. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak*. Airlangga University Press, Surabaya
- Huang FJ, Kao Chung L, Fu Tsai K, Meng Yin T, Chin Yang C, Hsuan Wei H, Yi Chi L and Shih Young Chang. 2004. *Human Cumulus-Free Oocyte Maturation Profile and in Vitro Developmental after Stimulation with Recombinant Versus Urinary FSH*. Dept Of Obstetrics and Gynecology Chang Gung Memorial Hospital Taiwan. *Human Rep.* Vol 19 : 306-315.
- Jacob, S., L. Drudy, R. Conroy. 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.
- Kash and Menon. 1998. *Identification of a Hormonally Regulated Hormone/human Chorionic Gonadotropin*

- Receptor m RNA Binding Protein. Incresed mRNA Binding During Receptor Down Regulation.* Departements Genecology, University of Michigan Medical School Ann Arbor. J.Biol.Chem. Vol. 273 (17): 10658 – 10664.
- Koninckx P.R. 2001. *Meta Analysis of Recombinant and Urinary FSH.* Dept of Obstetric gynaecology Univ. Hospital Gasthuisberg Lauven Belgium. Human Reprod Vol 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. *Historycal Perspective in Gonadotrophins Therapy.* Faculty of life Science Barhan University Ramat gan 52900. Israel. Human Reprod. 1-31.
- Mahaputra, L.; R. Ernawati dan D. Simomangkir. 1999. *Pembuatan Embryo Jantan dan Betina Secara Terpisah Serta Pengembangan Cell Line Sebagai Pemicu Pertumbuhan dengan Pengetahuan Teknik Bayi Tabung pada Sapi,* Laporan Penelitian Hibah Bersaing VII/I.
- Mahaputra, dan D. Simomangkir. 1999. *Supplement for In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Eggs; AComparison and Estrogen, Estrus Mare Serum and ESTRUS Cow Serum.* Folia Medica Indonesiana Airlangga University School of Medicine. Vol XXXV.
- Mahaputra, L. 2007. *Bioaktivitas Berbagai Serum Kuda Sebagai Substitusi Aditif FSH, Estrogen dan LH Saat Maturasi Oosit dalam Teknik Bayi Tabung pada Sapi.* Jurnal Bio Sains Pasca Sarjana Unair. 9. 29-24.
- Martino, A.; T. Mogas, Paloma, M.J and M.T. Paramio. 1994. *In Vitro Maturation and Fertilization of Prepubertal Goat Oocytes.* Theriogenology. (43) : 473 - 485.
- Ratnani, H. dan H.A. Hermadi. 1992. *Pengaruh hMG Pergonal Sero no Terhadap Birahi dan Kebuntingan pada Kambing.* Fakultas Kedokteran Hewan Unair.
- Simoni M.; J. Gromoll and N. Chlage. 1997. *The Follicle Stimulating Hormone Receptor : Bio Chemistry, Molekuler Biology, Physiology and Pathophysiology.* Institute of Reproductive Medicine of the University Domagkstrabe 11, D-48129 Muster endocrine reviews 18: 739 - 773.
- Sirard M.A. and R.D. Lambert. 1985. *In Vitro Fertilization of Bovine Follicular Oocyte Obtain by Laparoscopy.* Biol. Reprod (33) : 905-918.
- Suwarno, R. Ernawati, A.P. Rahardjo, N. Sianita, J. Rahmahani dan A.F. Rantam. 2003. *Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji Elisa.* Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Westergaard L.G.; K. Erb, Laursen, and P.E. Rasmussen. 1996. *The Effect of human Menopausal Gonadotrophin and Highly Purified Urine Derived Follicle Stimulating Hormone on The Outcome of In Vitro Fertilization in Down Regulated Normogonadotrophic Women.* Human Reprod. 11: 1209 - 1213.
- Westergaad L.G. 1999. *Monotropin LH Content and Assisted Reproduction Out Come. The First world congress on controversies in obstetrics.* Gynecology and Infertility Prague, Czech Republik.