

---

**MATURASI OOSIT IKAN NILA (*Oreochromis niloticus*) DENGAN PAPARAN ISOLAT INHIBIN DARI SEL GRANULOSA OVARIUM KAMBING**

*Maturation of Nile-Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Oocytes With Exposed by Goat Inhibin Isolated from Granulose Cells*

**Yulianus Linggi<sup>1</sup>, Aulanni'am<sup>2</sup>, Yenni Risjani<sup>3</sup>, dan Tongku N. Siregar<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Reproduksi Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Undana, Kupang

<sup>2</sup>Bagian Biokimia Fakultas MIPA Brawijaya, Malang

<sup>3</sup>Staf Pengajar Fakultas Perikanan Brawijaya, Malang

<sup>4</sup>Laboratorium Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Unsyiah, Aceh

**ABSTRAK**

Tujuan penelitian adalah mengetahui peran regulasi inhibin pada proses maturasi telur ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Inhibin yang digunakan berasal dari isolasi sel granulosa ovarium kambing yang disuntikkan ke dalam induk betina. Setelah 3 hari perlakuan, gonad dikeluarkan dengan cara pembedahan, kemudian dilakukan evaluasi maturasi di bawah mikroskop stereo. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata persentase telur yang mengalami maturasi pada dosis 0, 20, 40, dan 60 µg/ekor secara berurutan masing-masing sebesar 50,05; 29,44; 21,46; dan 30,83%. Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa paparan isolat inhibin dari sel granulosa ovarium kambing dapat menginduksi maturasi oosit (telur) ikan nila.

---

Kata kunci: inhibin, maturasi, oosit

**ABSTRACT**

*The present study aimed to investigate the role of inhibin in the regulation of oocytes maturation. Inhibin was isolated from goat granulose cells and injected by intraperitoneal in to female Nile-Tilapia. Three days later its gonad was taken by decapitation and the change of oocyte was evaluated under microscope. Results showed that average of percentages of oocytes that undergo matured after exposed with inhibin of 0, 20, 40, and 60 µg/individual 50.05, 29.44, 21.46, and 30.83%, respectively. The exposure of doses of goat inhibin in Nile-Tilapia showed significantly different ( $P<0.01$ ) to percentages of mature oocytes. It was concluded that exposition of goat inhibin from granulose cells can inducing the maturation of Nile-Tilapia oocytes.*

---

Keywords: inhibin, maturation, oocytes

## PENDAHULUAN

Proses pematangan gonad ikan secara garis besar dikontrol terutama oleh serangkaian aksi mediator yakni *gonadotropin hormone* (GTH), *maturation inducing hormone* (MIH), dan *maturation promoting factor* (MPF). Hormon gonadotropin sebagai mediator primer dihasilkan oleh kelenjar pituitari akan merangsang sel-sel granulosa untuk mensintesis dan mensekresi mediator sekunder yakni MIH. Selanjutnya, MIH akan beraksi pada permukaan oosit dan merangsang formasi mediator tertier dalam sitoplasma yakni MPF. Faktor MPF kemudian menginduksi terjadinya perubahan-perubahan oosit sehingga oosit menjadi matang (Kagawa, 1994). Mekanisme faktor internal dalam mempengaruhi proses reproduksi hampir sama pada setiap ikan sedang faktor eksternal berbeda-beda menurut jenis ikan. Namun, dapat disimpulkan bahwa kejadian akhir dari siklus reproduksi ikan adalah pelepasan telur dan atau sperma dari dalam gonad ke dalam air untuk proses fertilisasi lebih lanjut (Rottmann *et al.*, 1991).

Mekanisme reproduksi pada ikan dapat dimanipulasi sedemikian rupa sehingga pematangan oositnya dapat disesuaikan dengan produktivitas suatu perairan. Selama ini manipulasi lingkungan dan hormonal sudah terbukti efektif meningkatkan produksi ikan dari suatu perairan. Bahan yang sering digunakan untuk manipulasi hormon antara lain adalah ekstrak pituitari atau gonadotropin murni, LHRH murni atau dikombinasi dengan dopamin, dan steroid (Rottmann *et al.*, 1991). Selain hormon di atas, faktor lain yang diketahui ikut merangsang terjadinya pematangan telur ikan antara lain activin,

inhibin, dan follistatin (Wu *et al.*, 2000), *insulin-like growth factor* (IGF-1) (Reinecke *et al.*, 1997), *epithelial growth factor* (EGF), dan *transformation growth factor* (TGF $\alpha$ ) (Wang dan Ge, 2002).

Peran regulasi inhibin terhadap maturasi oosit ikan berbeda dengan maturasi oosit mamalia. Menurut Krassel *et al.* (2003), keberadaan molekul inhibin dalam darah mamalia berfungsi untuk menghambat sekresi FSH dan LH sehingga tidak terjadi superovulasi, tetapi hasil penelitian Wu *et al.* (2000) menyimpulkan bahwa secara *in vitro* inhibin dapat mematurasi oosit pada ikan zebra (*Danio rerio*). Katsu *et al.* (1993) mengemukakan ekspresi mRNA inhibin pada ikan salmon berbeda dengan ekspresi mRNA inhibin pada mamalia, sehingga diduga inhibin adalah salah faktor yang berperan mematangkan telur ikan. Hasil penelitian tersebut juga menunjukkan inhibin yang ada pada ikan zebra dan ikan salmon homolog dengan inhibin yang ada pada manusia dan mamalia lain. Untuk menguji peran regulasi inhibin dalam proses maturasi oosit ikan nila maka dilakukan pemaparan isolat inhibin yang berasal dari sel granulosa ovarium kambing.

## MATERI DAN METODE

Sebanyak 24 ekor induk betina yang gonadnya sudah berkembang dipilih dari kolam pembenihan BBI Sumber Mina, Kecamatan Dau Kabupaten Malang dan dipisah dari induk-induk lain. Selama pemeliharaan, ikan diberi pakan komersil secara *ad libitum*. Seminggu sebelum terjadinya pemijahan telur, ikan diberi perlakuan dengan isolat inhibin.

Isolat inhibin diperoleh dari sel granulosa ovarium kambing. Oosit diaspirasi dari ovarium kambing menggunakan jarum 18-22 G dan diamati di bawah mikroskop stereo. Sel granulosa yang mengelilingi oosit dikoleksi secara manual ke dalam tabung ukuran 2 ml. Hasil koleksi sel granulosa kemudian divortex 2-3 menit dan dilanjutkan dengan sonikasi selama 20 menit. Setelah sonikasi, sel granulosa kemudian disentrifus. Sebanyak 600  $\mu$ l supernatan diambil dan ditambahkan etanol dengan perbandingan 1:1. Campuran supernatan dan etanol kemudian disentrifus lagi dengan 3000 rpm pada suhu 4<sup>o</sup> C selama 30 menit untuk mendapatkan *crude* sel granulosa. Etanol dibuang dan endapan ditambahkan dengan 20  $\mu$ l Tris-Cl, kemudian disimpan dalam *freezer* sebelum dielektroforesis. Untuk memisahkan molekul inhibin dengan protein lainnya dilakukan elektroelusi dan kemudian molekul inhibin yang diperoleh dikonfirmasi dengan metode blotting.

Pemaparan inhibin ke dalam tubuh ikan dilakukan dengan cara injeksi intramuskular yang dilakukan pada pagi hari. Dosis inhibin yang disuntikkan adalah 0, 20, 40, dan 60  $\mu$ g /ekor. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 6 kali dengan

rincian 1 ekor 1 kali ulangan. Injeksi isolat inhibin dilakukan pada induk ikan yang sebelumnya telah dipastikan sedang tahap *fully grown oocyte* tetapi belum mencapai *final maturation* atau belum terjadi *germinal vesicel breakdown* (GVBD). Untuk mengetahui kondisi tersebut maka sesaat sebelum injeksi dilakukan pemeriksaan oosit secara visual dengan menggunakan kanula.

Deteksi maturasi dilakukan dengan cara mengeluarkan telur. Telur-telur kemudian diidentifikasi untuk melihat perubahan yang terjadi. Data utama yang dikumpulkan adalah terjadinya GVBD sebagai tanda maturasi akhir sedang berlangsung. Persentase oosit yang mengalami GVBD dilihat di bawah mikroskop stereo dengan pembesaran 20-30X. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah dan dilanjutkan dengan uji BNT.

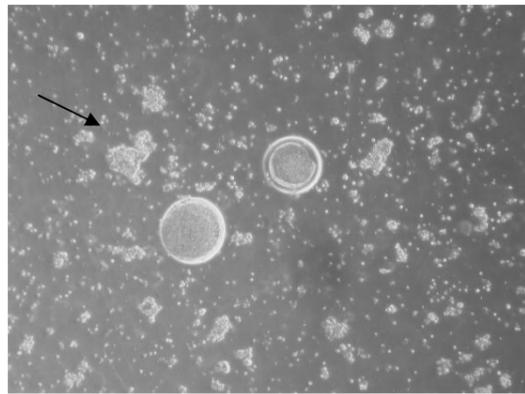
## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolat Inhibin

Ovarium yang digunakan diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Sukun Kota Malang dengan diameter berkisar



A



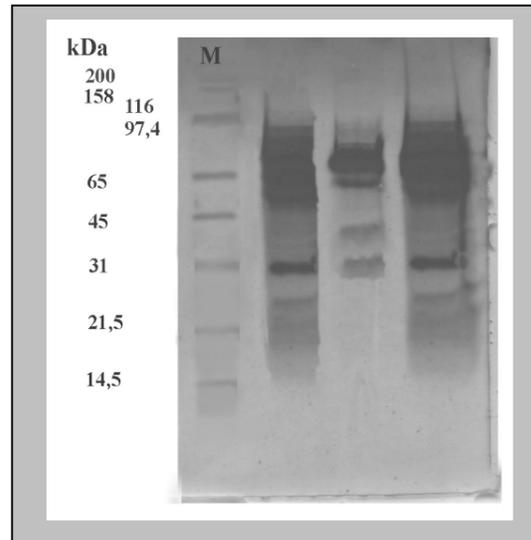
B

Gambar 1. (A) Folikel yang menyembul berwarna bening (anak panah) dari permukaan ovarium kambing, (B) Sel granulosa (anak panah) yang terlepas dari oosit hasil aspirasi

antara 6–22 mm (Gambar 1). Folikel yang digunakan berukuran >2 mm. Aspirasi oosit dilakukan menggunakan syringe 18-22 G. Sel granulosa dipisahkan dari oosit secara mekanis. Di bawah mikroskop stereo, sel-sel granulosa nampak berbentuk bulat-bulat kecil (granula) berwarna bening yang jika sudah terlepas dari oositnya membentuk kerak-kerak berlapis agak melingkar dan berwarna bening. Untuk dapat menghasilkan ekstrak diperlukan sejumlah sel granulosa yang berasal dari minimal 40 folikel. Jumlah folikel yang dikumpulkan dalam setiap tabung mikro sebanyak 100–120 folikel. Ekstrak yang diperoleh dari hasil sentrifugasi sel granulosa setiap *microtube* berkisar antara 30–80  $\mu$ l dengan rata-rata kadar protein inhibin sebesar 227 ppm.

Hasil elektroforesis (SDS-PAGE) diperoleh beberapa pita gel. Salah satu pita mempunyai berat molekul 32 kDa yang diukur menggunakan protein *marker* (Gambar 2). Protein dengan berat molekul sebesar ini dikonfirmasi sebagai molekul inhibin sesuai dengan pendapat Woodruff dan Mayo (1990) bahwa bentuk matang molekul inhibin adalah 32 kDa yang terdiri dari suatu rantai  $\alpha$  (18 kDa) dan suatu rantai  $\beta$  (14 kDa) yang dihubungkan oleh jembatan sulfida. Beberapa pendapat mengatakan berat molekul inhibin sebagai glikoprotein pada spesies-spesies mamalia sangat bervariasi. Ireland *et al.* (1994) menemukan 8 bentuk berat molekul inhibin yakni 29, 34, 48, 58, 68, 77, 122, dan >160 kDa sedang Guthrie and Garrett (2000) menemukan 4 bentuk berat molekul pada babi, yakni 69, 121, 227, dan >227 kDa. Woodruff dan Mayo (1990) menjelaskan bahwa bentuk inhibin matang dengan berat molekul 32 kDa berasal dari proses

proteolitik molekul inhibin yang lebih besar.

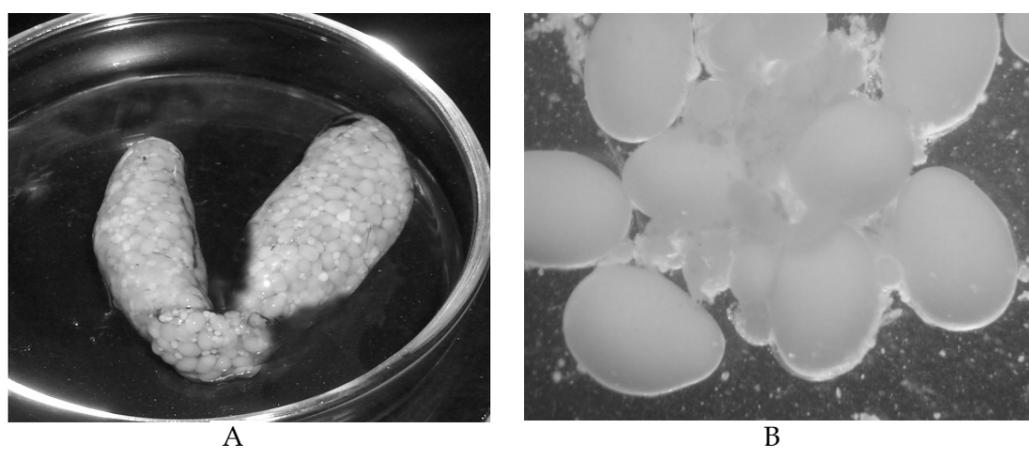


Gambar 2. Pita elektroforesis yang menunjukkan adanya protein dengan berat molekul 32 kDa

Adanya variasi berat molekul inhibin ini kemungkinan berhubungan dengan status folikel dan stadium reproduksi yang digunakan sebagai sumber inhibin. Hal ini diperkuat oleh pendapat Sunderland *et al.* (2005) pada folikel dominan yang mengalami atresi, proporsi inhibin dengan berat molekul 110 dan >160 kDa lebih rendah dibanding inhibin dengan berat molekul 32 kDa. Folikel dominan pada fase folikuler mempunyai proporsi inhibin dengan berat molekul 29 kDa rendah tetapi proporsi inhibin dengan berat molekul >110 kDa tinggi.

#### Kondisi Gonad

Gambar 3 menunjukkan bahwa gonad ikan yang dikeluarkan dengan kantong peritonealnya berwarna bening sehingga telur yang ada di dalam nampak jelas berwarna kuning muda. Masing-masing ikan mempunyai dua kantong gonad yang terletak di sisi kiri dan kanan tetapi kedua kantong tersebut bermuara



Gambar 3. (A) Gonad yang berisi seluruh telur ikan nila dan masih terbungkus kantong peritoneal, (B) Tampilan telur ikan nila sebelum injeksi isolat inhibin

pada satu saluran yang berfungsi sebagai saluran untuk mengeluarkan telur-telurnya pada saat terjadi pemijahan. Ukuran panjang gonad yang diperoleh berkisar antara 1,5–4,5 cm sedang isi gonad berupa telur-telur secara keseluruhan mempunyai ukuran diameter yang tidak seragam walaupun berada dalam kantong peritoneal yang sama. Sebaran ukuran diameter (tanpa pertimbangan tahapan perkembangan telur) dibagi menjadi ukuran kecil, sedang, dan besar (Tabel 1).

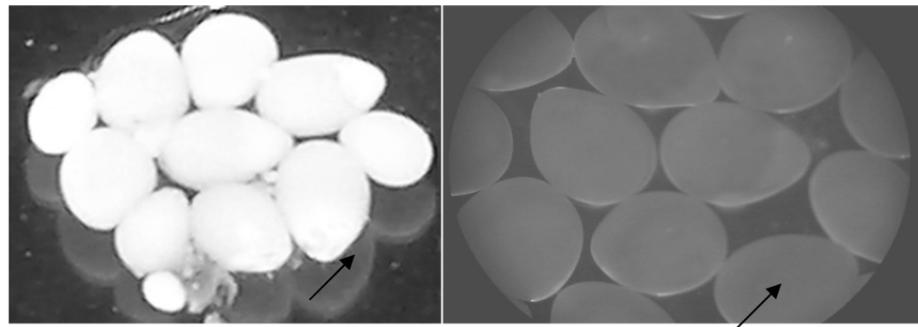
Perubahan kondisi pada telur setelah dipapari inhibin dibandingkan dengan kondisi telur sebelum dipapari inhibin terlihat pada Gambar 3B. Gambar tersebut menunjukkan kondisi tampilan telur yang belum matang (*fullygrown*). Telur yang belum dipapari inhibin berwarna lebih pudar dan belum tampak adanya inti. Hal ini menandakan telur tersebut belum

memasuki tahap maturasi akhir. Meskipun demikian, beberapa telur ikan telah mengalami pergerakan inti ke arah pinggir yakni ke arah kutub *animal*. Kondisi ini menunjukkan telur yang akan memasuki tahap GVBD atau tahap maturasi akhir (Rottman *et al.*, 1991). Pada tahap ini, inti telur nampak lebih putih dari bagian lainnya dan kutub *animal* yang lebih runcing dibanding telur yang intinya belum bergerak ke arah pinggir (Gambar 4).

Tiga hari setelah diinjeksi dengan isolat inhibin terjadi perubahan tampilan telur pada hampir semua ikan. Sebagian telur mengalami perubahan tampilan yakni bagian putih di ujung kutub *animal* sudah menyebar ke arah kutub vegetatif serta warna telur nampak lebih kuning dari sebelumnya (Gambar 5). Kondisi ini dapat disebut sebagai kondisi telur yang telah memasuki tahap maturasi akhir. Billard

Tabel 1. Sebaran jumlah telur berdasarkan kategori ukuran diameter gonad ikan nila 3 hari setelah injeksi inhibin.

Diameter gonad	Besar ( > 0,75 mm )	Medium ( 0,4 - 0,75 mm )	Kecil ( < 0,4 mm )
Kisaran jumlah telur	589 - 1075	189 - 359	191 - 402
Prosentase rata-rata (%)	60	20	20



Gambar 4. Inti telur ikan nila (tanda panah) sudah berada kutub animal

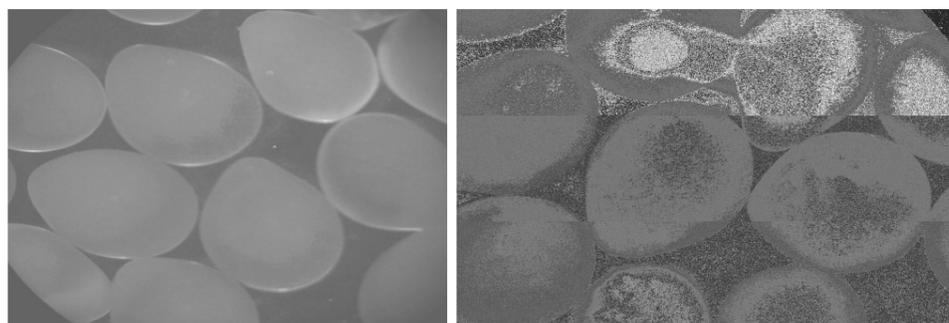
(1993) dan Kagawa (1994) menyatakan bahwa tahap maturasi akhir pada oosit organisme Teleostei (ikan bertulang sejati) ditandai dengan adanya GVBD, kondensasi kromosom dan terbentuknya *spindle*. Wolfe (1993) menjelaskan mekanisme terjadinya GVBD yakni hancurnya membran inti oosit sebagai akibat dari adanya fosforilasi protein lamin yang terdapat dalam membran inti sehingga terjadi degradasi membran yang semula membungkus inti oosit. Terjadinya kondensasi kromosom dijelaskan dipicu oleh fosforilasi histon-1 yang terdapat dalam kromatin. Dalam proses meiosis kejadian tersebut merupakan rangkaian kejadian reduksi jumlah kromosom menjadi haploid sebelum terjadinya zigot (Lewin, 2004).

Mekanisme intraselluler maturasi akhir pada prinsipnya diawali dengan adanya fosforilasi. Katsu *et al* (1993) dan Yamashita dan Nagahama (1995) menjelaskan mekanisme kejadian maturasi akhir pada ikan dimulai dengan adanya

aksi MIH dari sel granulosa yang merangsang terjadinya aktivasi MPF, MPF kemudian mem-fosforilasi protein-protein target termasuk lamin dan histon.

#### Prosentase *Germinal Veshicle Breakdown* (GVBD)

Telur yang mengalami GVBD diidentifikasi sebagai telur dengan kondisi inti yang semula tampak putih di kutub *animal* tidak nampak lagi tetapi permukaan telur diselubungi oleh bintik-bintik dari arah kutub animal ke kutub vegetatif. Jumlah telur yang mengalami GVBD didata menggunakan *handy counter* kemudian ditransfer menjadi prosentase dari jumlah sampel telur yang teramati. Rata-rata prosentase GVBD pada ikan-ikan yang tidak mendapat injeksi isolat inhibin sebesar 5,06% sedang pada ikan yang mendapat injeksi isolat inhibin dengan dosis 20, 40, dan 60  $\mu\text{g}$  masing-masing sebesar 29,44; 21,46; dan 30,83% (Tabel 2).



Gambar 5. Tampilan telur ikan yang telah mengalami GVBD

Tabel 2. Prosentase jumlah telur ikan nila (%) yang mengalami GVBD (*Germinal Veshicle Breakdown*)

Perlakuan ( $\mu\text{g}$ )	Prosentase GVBD (%) setiap ulangan						Rerata
	1	2	3	4	5	6	
0	4,48	0	0	5,71	4,76	15,38	5,06
20	32,05	28,79	21,21	8,00	31,51	55,10	29,44
40	25,45	5,17	24,68	22,22	35,42	15,79	21,46
60	35,14	32,35	28,36	37,74	18,06	33,33	30,83

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pemaparan isolat inhibin dari sel granulosa ovarium kambing dapat mempengaruhi ( $P>0,05$ ) terjadinya GVBD pada oosit ikan nila meskipun tidak terdapat perbedaan antar kelompok perlakuan dosis. Ini menunjukkan bahwa semakin besar dosis inhibin yang diberikan tidak meningkatkan laju pematangan akhir. Hal ini senada dengan pendapat Hsueh *et al.* (1987) yang mengatakan bahwa dinamika respon seluler terhadap inhibin dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk rasio relatif antara jumlah inhibin dan jumlah activin serta family TGF $\beta$  lainnya

#### Regulasi Inhibin Terhadap Maturasi Oosit Ikan Nila

Inhibin adalah protein yang disekresikan oleh sel granulosa pada hewan betina dan sel Sertoli pada jantan sebagai respon terhadap kehadiran FSH. Protein ini banyak ditemukan dalam seminal plasma dan cairan follikel. Selama ini diketahui bahwa inhibin pada mamalia dan manusia mempunyai aksi terutama sebagai kontrol *feedback* negatif terhadap sekresi FSH (Kaneko *et al.*, 1995; Donadeu dan Ginther, 2001).

Activin dan inhibin pada mamalia mempunyai banyak peran dalam proses fisiologis termasuk sistim reproduksinya. Dalam proses reproduksi inhibin bersama

aktivin diketahui meregulasi pelepasan GnRH dari hipotalamus dan FSH dari pituitari (Calogero *et al.*, 1998). Secara spesifik, activin dan inhibin dalam sistim reproduksi berperan pada steroidogenesis, proliferasi spermatogonia, proliferasi sel granulosa, modulasi FSH, pertumbuhan folikel, dan maturasi (Wu *et al.*, 2000). Hampir semua studi menyatakan aktivitas activin bertentangan dengan inhibin dalam proses biologi reproduksi. Namun, Wang dan Ge (2004) menemukan aktivitas kedua bahan tersebut sama-sama merangsang pelepasan gonatropin II pada sel-sel pituitary ikan *Carassius auratus*. Selain itu Alak *et al.* (1996) menyatakan bahwa activin dan inhibin keduanya mampu meningkatkan laju maturasi oosit pada kera betina dan mungkin perbedaan konsentrasi kedua bahan tersebut dapat menyebabkan aksi yang berbeda.

Pendapat di atas akan dapat menjelaskan peranan inhibin yang berasal dari ovarium kambing pada ikan nila justru sebagai regulator terjadinya maturasi. Beberapa dugaan yang memungkinkan terjadinya maturasi oosit pada ikan nila setelah dipapari inhibin antara lain produk *signaling pathway* yang berbeda dari mamalia seperti yang dilakukan oleh Woddruff dan Mather (1993) yang menginjeksi inhibin langsung ke dalam ovari tikus yang belum matang. Injeksi

tersebut dapat memicu pertumbuhan folikel. Hsueh *et al.* (1987) menyatakan bahwa inhibin dapat meregulasi maturasi folikel dengan cara menstimulasi produksi androgen pada sel teka. Kemungkinan lain adalah ikatan inhibin dengan reseptornya berbeda dari mamalia. Matthews *et al.* (1991) menjelaskan mekanisme aksi aktivin dan inhibin yakni aktivin akan berikatan dengan reseptor aktivin tipe II kemudian menstimulasi reseptor tipe I dan bergabung dengan tipe II sehingga dapat menstimulasi signal-signal berikutnya sampai pada gen target. Aksi inhibin juga menggunakan reseptor aktivin tipe II sehingga reseptor tipe II akan gagal menyatu dengan reseptor tipe I, akibatnya aktivin terhambat melakukan fungsinya. Berbeda dengan pendapat Matzuk (2000) yang mengatakan bahwa kemampuan berikatan inhibin pada reseptor aktivin tipe II adalah 10 kali lebih rendah dibanding aktivin. Inhibin mempunyai reseptor spesifik yakni p120 yang fungsinya sama dengan reseptor tipe II kemudian reseptor spesifik tersebut bergabung dengan reseptor tipe I.

#### KESIMPULAN

Isolat inhibin dari sel granulosa ovarium kambing dapat meregulasi terjadinya maturasi akhir pada oosit ikan nila (*Oreochromis niloticus*).

#### DAFTAR PUSTAKA

Alak, B.M., G.D. Smith, T.K. Woodroff, S.R. Stouffer, and D.P. Wolf. 1996. Enhancement of primate oocyte and fertilization in vitro by Inhibin A and activin A (abstract). **J. Fertil. Steril.** 66:646-653.

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.

Billard, R. 1993. Hormonal Control of Gametogenesis. Edited by Muir, J.F. and R.J. Roberts. 1993 in **Recent Advances in Aquaculture**. IV, Blackwell Scientific Publications, Oxford, USA.

Cologero, A.E., N. Burello, M. Ossina, P. Polosa, and R. D'Agata. 1998. Activin A stimulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release by the explanted male rat hypothalamus: interaction with inhibin and androgen (abstract). **J. Endocrinol.** 156:269-274.

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.

Guthrie, H.D. and W. Garret. 2000. Physiology and expression of inhibin/activin transcripts and different molecular forms of inhibin protein during follicle in pigs. **Agricultural Research Service.** (Abstract).

Hsueh, A.J., K.D. Dahl, J. Vaughan, E. Tucker, and E. Rivier. 1987. Heterodimer of inhibin subunit have different paracrine action in the modulation of LH stimulated androgen production. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 84(50):82-86.

Ireland, H.J.L., T.E. Good, P.G. Knight, and J.J. Ireland. 1994. Alterations in amounts different forms of inhibin

- during follicular atresia. **Biol. Reprod.** 50:1265-1276.
- Kagawa, H. 1994. Oogenesis. In Hochachka, P.W. and T.P. Momsen. 1994. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Volume 3, Series Analytical Techniques. Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Kaneko, 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.
- Katsu, Y., M. Yamashita, H. Kajiura, and Y. Nagahama. 1993. Behavior of the components of maturation-promoting factor, CDC-kinase and cyclin B, during oocyte maturation of goldfish (abstract). **J. Developmental Biology.** 160(1):99-107.
- Krassel, F.J., M.E. Winn, D. Burns, J.L.H. Ireland, and J.J. Ireland. 2003. Evidence for a Negative Intrafollicular Role for Inhibin in Regulation of Estradiol Production by Granulosa Cells. **J. Endocrinology.** 144(5):876-886.
- Lewin, B. 2004. **Gene VIII**. Published By Pearson Education Inc, Pearson Prentice Hall. USA.
- Matthews, L.S. 1991. Activin receptors and cellular signaling by the reseptor serine kinase family (abstract). **Endocrin. Rev.** 15:310-325.
- Matzuk, M.M. 2000. Editorial: In search of binding-Identification of inhibin receptors. **J. Endocrinology.** 141(7): 2281-2284.
- Rottmann, R.W., J.V. Shireman, and F.A. Chapman. 1991. **Introduction to Hormon-Induced Spawning of Fish.** SRAC Publication 421.
- Sunderland, S.J., P.G. Knight, M.P. Boland, J.F. Roche, and J.J. Ireland. 2005. Alteration in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular and luteal-phase dominant follicles in heifers. <http://www.vetmed.ucd/index.htm>.
- Wang, Y. and W. Ge. 2004. Development profiles of activin  $\beta$ <sub>a</sub>,  $\beta$ <sub>b</sub> and follstatin expression in the zebrafish ovary : evidense for their differential roles during sexual maturation and ovulatory cycle. **J. Biology of Reproduction.** 71:2056-2064.
- Wolfe, S. 1993. **Molecular an Cellular Biology.** Wadsworth Publising Company, Belmont California.
- Woodruff, T.K. and J.P. Mather. 1993. Inhibin, Activin and the female reproductive axis. **Annu. Rev. Physiol.** 57:719-766.
- Woodruff, T.K. and K.E. Mayo. 1990. Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. **Annu. Rev. Physiol.** 52:807-821.
- Wu, T., H. Patel, S. Mukai, C. Melino, R. Garg, X. Ni, J. Chang, and P. Chun. 2000. Activin, Inhibin and Follistatin in Zebrafih Ovary: Expression and Role in Oocyte Maturation. **J. Biology of Reproduction.** 62:1585-1592.
- Yamashita, M. and Y. Nagahama. 1995. Molecular mechanism of the formation and activation of Maturation Promoting Factors (MPF) during fish oocyte maturation, **Proc. Biotechnology Applications in Aquaculture.** 10:1-15.

