

REGULASI HORMON TERHADAP EKSPRESI GEN PADA AYAM HUTAN (*Gallus sp*)

MASITTA TANJUNG, S.Si.,M.Si.

Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Program Studi Biologi
Universitas Sumatera Utara

I. PENDAHULUAN

Dalam era industrialisasi salah satu upaya terobosan dalam meningkatkan produksi dan efisiensi usaha termasuk usaha pertanian. Saat ini telah berkembang rekayasa genetika yang akan memberikan harapan bagi industri pertemakan, baik yang berkaitan dengan masalah produksi, pakan maupun medis veteriner. Potensi pengembangan dan penerapan bioteknologi peternakan tersebut sangat besar termasuk Indonesia.

Dalam dasawarsa terakhir ini peranan bioteknologi semakin hari semakin bertambah besar yaitu dalam menunjang kegiatan pengembangan. Cakupan bioteknologi cukup luas, baik yang baru dalam tahap penelitian maupun yang sudah dapat diaplikasikan. Pada umumnya diasosiasikan sebagai rekayasa genetika (genetic engineering) dan biologi molekuler.

Penelitian dan pengembangan hormon dan produksi biologi lainnya diarahkan untuk diagnosa dini baik untuk penyakit maupun untuk kebuntingan. Aplikasi lain adalah untuk memacu pertumbuhan yang lebih cepat. Selain hormon ada 3 bagian biologi yang akan diteliti dan dikembangkan, yaitu metabolik sekunder, biokonversi dan analisis genetika.

Aplikasi bioteknologi dibidang peternakan yang sedang digarap meliputi 3 bagian utama yaitu bioteknologi produksi, bioteknologi pakan dan bioteknologi molekuler, meliputi :

1. Bioteknologi reproduksi, seperti: inseminasi buatan, transfer embrio dan rekayasa genetika meliputi 19 jenis ternak/hewan yang perlu dikembangkan.
2. Bioteknologi pakan ternak yang terdiri dari bioteknologi pakan hijau dan konsentrat.
3. Bioteknologi molekuler dibidang kesehatan hewan dan produksi bahan vaksin dan bahan obat (anti biotik, probiotik, immunoregulator hormon).

Reproduksi dan pertumbuhan ternak dipengaruhi oleh hormon seperti steroid maupun peptida. Dalam kemajuan, bidang rekayasa genetika sangat dimungkinkan untuk mengisolasi gen target. Kloning gen target sangat dibantu dengan adanya tehnik hibridisasi maupun amplikasi gen secara in vitro dengan proses reaksi polimerase berantai (PCR). Untuk keperluan hibridisasi diperlukan DNA pelacak (probe). Probe ini dapat berupa potongan gen yang mempunyai aktivitas serupa atau dapat berupa oligonukleotida yang disintesa berdasarkan informasi asam amino penyusun protein. Untuk teknik PCR diperlukan informasi urutan asam nukleat yang mengapit gen target yang digunakan sebagai dasar penyusun primer oligonukleotida dengan menggunakan DNA synthesizer.

Protein berperan dalam semua aktivitas kehidupan sebab protein terlibat dalam setiap aspek kehidupan seperti katalis struktur, regulasi dan sebagainya (Wiriyosuhanto, dkk. 1993). Hormon yang juga mengandung protein, dan juga akan berpengaruh pada pengaturan terhadap ekspresi gen, hal ini dapat dipelajari pada beberapa jenis hewan, termasuk ayam hutan hijau (*Gallus varius*).

Beberapa jenis ayam yang akan kita kenal sekarang ini berasal dari ayam hutan sebagai nenek moyangnya. Sampai saat ini ayam hutan (*species Gallus*) yang masih hidup ada 4 *Gallus*, seperti *Gallus varius* (green jungle fowl), *Gallus gallus* atau *Gallus benkiva* (red jungle fowl), *Gallus lafayetti* (ceylonese jungle fowl) dan *Gallus sonnerati* (grey jungle fowl).

Gallus varius (green jungle fowl) yakni ayam hutan hijau yang masih dapat dijumpai hidup di hutan-hutan pulau Jawa khususnya Jawa Tengah, Jawa Timur, Pulau Madura, Bali dan Lombok, Flores, Nusa Tenggara dan lain-lain.

Tanda-tanda khas pada *Gallus* ini adalah sebagai berikut:

- Warna buill yang jantan dilapisi oleh lapisan hijau pada permukaan atasnya. Oleh karena itu disebut juga green jungle fowl, sedangkan betina berwarna coklat kekuning-kuningan.
- Jenggernya satu buah (single cowb) bentuknya licin tidak bergerigi pada permukaan atas. .
- Fialnya satu helai yang terletak antara kedua belah tulang rawan
- Bulu ekor utama sebanyak 16 helai.
- Bulu leher ayam jantan bulat dan pendek-pendek.
- Kokoknya kedengaran seperti cek-ci -crek atau tidak Dada yang berbeda (Mufarid, 1997).

Beberapa tahun yang lalu harga seekor ayam hutan tidak sebanding dengan usaha penangkapannya. Pekerjaan yang dahulu hanya iseng-iseng sekarang lain menjadi semiprofesional sebagai akibatnya beberapa ayam hutan di pulau Jawa populasinya menurun, selanjutnya ayam hutan yang sempat dijual di pasar dan sampai ke tangan pembeli atau pemelihara, biasanya tidak akan berumur panjang. Hanya beberapa hari ada di rumah, ayam hutan ketakutan betelur, luka pada sayap dan kepala, tidak mau makan dan akhirnya mati (Mufarid, 1997).

Untuk mengantisipasi hal tersebut diperlukan usaha pelestarian ayam hutan, terutama ayam hutan hijau (*Gallus varius*), maka diperlukan pengkajian yang mendalam untuk menelusuri kehidupannya. Dalam hal ini penulis mencoba meninjau regulasi hormonal terhadap ekspresi gen ayam hutan hijau (*Gallus varius*).

II. REGULASI HORMON

Pengendalian, pengaturan dan koordinasi aktivitas gel, jaringan dan alat-alat tubuh dilakukan oleh sistem saraf dan hormon. Meskipun fungsi saraf dan hormon berbeda tetapi banyak kaitan yang terjadi antara sistem saraf dan hormon, misalnya ada beberapa kelenjar bersekresi hanya bila ada stimulus yang terdapat di kelenjar seperti pada kelenjar adrenal bagian medula dan neurohipofisa.

Baik vertebrata maupun invertebrata mempunyai jaringan khusus yang mensekresikan zat pengatur yang langsung disalurkan ke dalam darah. Jaringan khusus ini dikenal sebagai kelenjar endokrin, sedangkan zat pengatur yang disekresikan di sebut hormon. Pada saat ini telah diketahui banyak hormon bertindak sebagai messenger pertama yang merupakan seri dari messenger berikutnya sehingga mengarah kepada adanya respon spesifik di gel target. (Wulangi, 1989).

Sifat-sifat kimia hormon.

Hormon merupakan bahan kimia yang disekresikan ke dalam cairan tubuh oleh satu sel atau sekelompok sel dan dapat mempengaruhi fisiologi sel-sel tubuh lainnya. Sebahagian besar hormon disekresikan oleh kelenjar endokrin dan selanjutnya ke dalam darah diangkut ke seluruh tubuh. Secara kimiawi hormon dapat dibagi dalam 3 tipe dasar, Yaitu :

1. Hormon steroid; golongan ini merupakan struktur kimia yang mirip dengan kolesterol dan sebagian besar tipe ini berasal dari kolesterol. Ada bermacam-macam hormon steroid yang disekresikan oleh (a) korteks adrenal (kortisol dan aldosteron), (b) ovarium (estrogen dan progesteron), (c) testis (testosteron) dan (d) plasenta (estrogen dan progesteron).
2. Derivat asam amino tirosin; ada 2 kelompok hormon yang merupakan derivat asam amino tirosin yaitu tiroksi dan triiodotironin, merupakan bentuk iodinisasi dari derivat tirosin, dan kedua hormon utama yang berasal dari

medula adrenal epinefrin dan norepinefrin, kedua-duanya merupakan katekolamin yang berasal dari tirosin.

3. Protein atau peptida. Pada dasarnya semua hormon endokrin yang terpenting dapat merupakan derivat protein, peptida atau derivat keduanya. Hormon yang disekresikan kelenjar hipofisis anterior dapat merupakan molekul protein atau polipeptida besar; hormon hipofisis posterior, hormon antidiuretik dan oksitosin merupakan peptida asam amino. Insulin, glukagon dan parathormon merupakan polipeptida besar (Guyton, 1994).

Hormon yang disekresi oleh hipotalamus merupakan peptida-peptida pendek yang mempunyai tiga sampai lima belas residu asam amino. Hormon-hormon ini dapat diisolasi dan diidentifikasi sesudah melalui penelitian selama bertahun-tahun. Sebagai contoh 1 mg faktor hormon pelepas tirotropin yang dapat diisolasi dari 4 ton jaringan yang mendapat hadiah nobel pada tahun 1977 (Lehninger, 1994).

Ada lima metode yang digunakan dalam studi hormon atas kelenjar endokrin yaitu;

1. Ekstirpasi kelenjar endokrin. Suatu alat tubuh dapat diidentifikasi mempunyai fungsi endokrin bila alat tubuh ini diambil atau di inaktifkan. Misalnya dengan jalan diradiasi akan terjadi perubahan dalam struktur maupun fungsinya, perubahan-perubahan akan hilang bila kita menyuntikan hormon dari kelenjar yang normal atau bila kita menyuntikan hormon atau transplanti dari jaringan kelenjar.
2. Metode menyuntikan, dengan menyuntikan suatu hormon tertentu kita dapat mengetahui pengaruhnya.
3. Metode klinik, dengan metode klinik dapat ditentukan hubungan tidak berfungsinya tubuh dengan kelainan kelenjar.
4. Metode analitik, analisis perlu dilakukan untuk mengetahui ada atau tidak adanya hormon dalam darah, urin, saliva dan cairan tubuh.
5. Metode perunut zat radioaktif digunakan untuk melokasikan dan mencari jejak hormon di dalam tubuh (Wulangi, 1989).

Mekanisme kerja hormon

Hormon endokrin hampir tidak pernah bekerja secara langsung pada sistem intra seluler untuk mengatur berbagai reaksi kimia dalam sel. Hormon mula-mula berikatan dengan reseptor hormon yang terdapat di permukaan sel atau di dalam sel. Ikatan hormon dan reseptor memulai timbulnya rangkaian reaksi kimia di dalam sel. Setiap reseptor sangat spesifik untuk satu macam hormon. Keadaan inilah yang menentukan macam hormon yang akan bekerja pada suatu jaringan tertentu. Jaringan target yang berpengaruh adalah jaringan yang mempunyai reseptor spesifik (Guyton, 1994).

Pada umumnya lokasi reseptor dari berbagai macam hormon adalah sebagai berikut;

- Pada membran sel, reseptor pada membran sangat khusus untuk hormon golongan protein, peptida dan katekolamin.
- Di dalam sitoplasma, reseptor untuk berbagai hormon steroid dapat dijumpai hampir semuanya di dalam sitoplasma.
- Di dalam inti, reseptor untuk hormon metabolisme tiroid (tiroksin dan triiodotironin), ditemukan di dalam inti, diduga terletak dalam hubungan langsung dengan satu atau lebih kromosom.

Jumlah reseptor di dalam suatu sel target tidak konstan, sebab reseptor protein ini akan rusak sendiri atau dengan mekanisme pembentukan protein di dalam sel dapat terbentuk reseptor baru. Hormon steroid dan tiroksin mengubah fungsi sel dengan cara mengaktifkan gen, tetapi dengan mekanisme yang sedikit berbeda. Hormon steroid merupakan hormon yang larut dalam lemak, sehingga dengan mudah dapat menembus membran sel menuju ke sel target. Setelah masuk ke dalam sel, hormon steroid mengadakan ikatan dengan reseptor yang ada dalam sitoplasma membentuk hormon reseptor kompleks. Selanjutnya

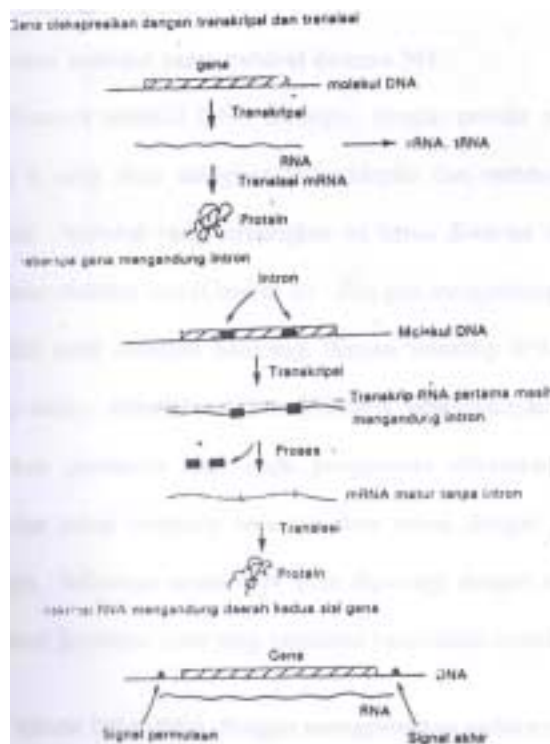
hormon reseptor kompleks di translokasikan ke dalam nukleus dan mengadakan interaksi dengan gen yang khusus. Gen yang diaktifkan kemudian membentuk enzim yang penting untuk mengubah fungsi sel.

III. EKSPRESI GEN

Gen adalah sepotong DNA yang menyandikan rantai polipeptida dan RNA. Tidak semua gen diekspresikan secara tepat dalam bentuk rantai polipeptida. Beberapa gen menyandikan beberapa jenis RNA transfer dan gen lain menyandi berbagai jenis RNA ribosomal. Gen yang menyandi polipeptida dan RNA dikenal sebagai gen struktural. Gen ini menentukan struktur beberapa produk akhir gen, seperti suatu enzim atau RNA yang stabil. DNA juga mengandung segmen atau urutan lain yang hanya menjalankan fungsi pengaturan (regulasi). Beberapa diantara segmen pengatur menyusun isyarat yang menunjukkan awal dan akhir gen struktural, yang lain berpartisipasi dalam memulai atau mengakhiri proses transkripsi gen struktural. Jadi kromosom mengandung gen struktural dan urutan pengatur (Lehninger, 1994).

Semua gen harus diekspresikan agar berfungsi. Tahap pertama dalam ekspresi adalah transkripsi gen menjadi untaian RNA yang komplementer. Untuk beberapa gen yang mengkode molekul tRNA dan rRNA transkripsi itu sendiri merupakan molekul yang penting secara fungsional.

Untuk gen-gen lain transkripsi ditranslasi menjadi molekul protein. Potongan gen yang tidak terdapat pada transkripsi disebut intron. Disamping intron, lokasi titik permulaan dan titik akhir transkripsi sangat penting diperhatikan. Kebanyakan transkrip tidak hanya merupakan kopi gen tetapi juga daerah nukleotid pada kedua sisinya. Signal atau isyarat menentukan permulaan dan akhir proses transkrip. Signal terletak dalam urutan polinukleotid pendek yang mengatur kerja enzim polimerase yang menstranskrip.



Gambar 1. Beberapa hal yang penting dalam ekspresi gen

Kebanyakan metode analisis transkrip didasarkan kepada hibridisasi antara transkrip RNA dengan fragmen DNA yang mengandung gen bersangkutan. Pada hibridisasi asam nukleat, hibridisasi antara untai DNA komplementer dengan untai RNA terjadi sama cepatnya dengan hibridisasi antara molekul DNA untai

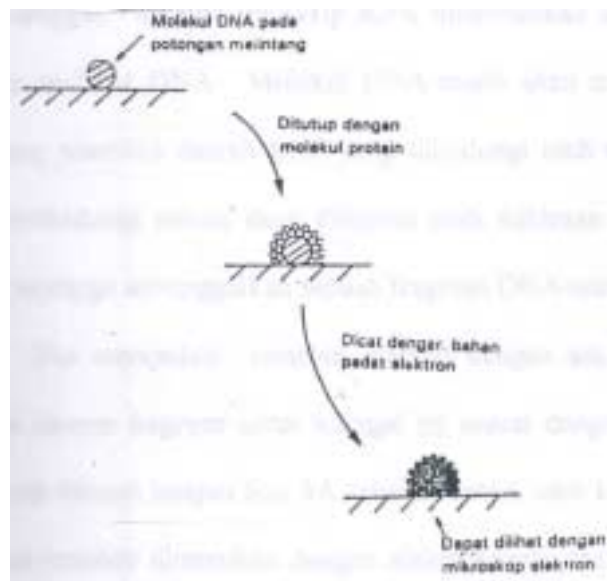
tunggal Hasil hibrid DNA-RNA dapat dianalisis dengan mikroskop elektron atau dengan nuklease yang spesifik.

Pengamatan molekul asam nukleat dengan ME

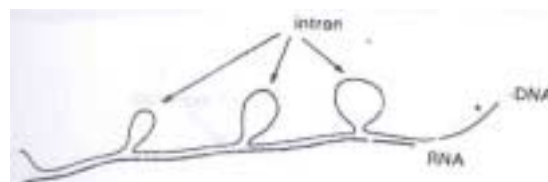
Biasanya molekul DNA dicampur dengan protein seperti sitokrom misalnya sitokrom c yang akan mengikat polinukleotid dan membungkusnya dalam lapisan yang tebal. Molekul yang terbungkus ini harus diwarnai dengan uranil asetat atau bahan padat elektron lain (Gambar 2). Jika gen mengandung intro maka daerah untai DNA tidak akan memiliki homologi dengan transkrip RNA, sehingga tidak terjadi pasangan basa. Sebaliknya akan terbentuk pelengkungan keluar (loop out) yang memberikan gambaran khas pada pengamatan mikroskop elektron (Gambar 3). Jumlah dan posisi lengkung tersebut akan sesuai dengan jumlah dan posisi intron dalam gen. Informasi selanjutnya akan diperoleh dengan melakukan perunutan gen dan mencari gambaran khas yang menandai batas-batas intron.

Analisa hibrid DNA-RNA dengan menggunakan nuklease

Hibrid DNA-RNA melibatkan penggunaan nuklease spesifik untuk untai tunggal seperti nuklease S 1, enzim ini memecah DNA atau RNA untai tunggal, termasuk daerah untai tunggal pada ujung molekul yang terutama beruntai ganda atau pada hibrid DNA-RNA. Jika molekul DNA yang mengandung gen dihibridisasi dengan transkrip RNANYa dan kemudian diberi nuklease S 1, maka daerah untai tunggal DNA non hibrid pada tiap ujung hibrid akan didigesti bersama-sama dengan intron yang melengkung keluar (Gambar 4).



Gambar 2. Preparasi molekul DNA dengan pengamatan ME



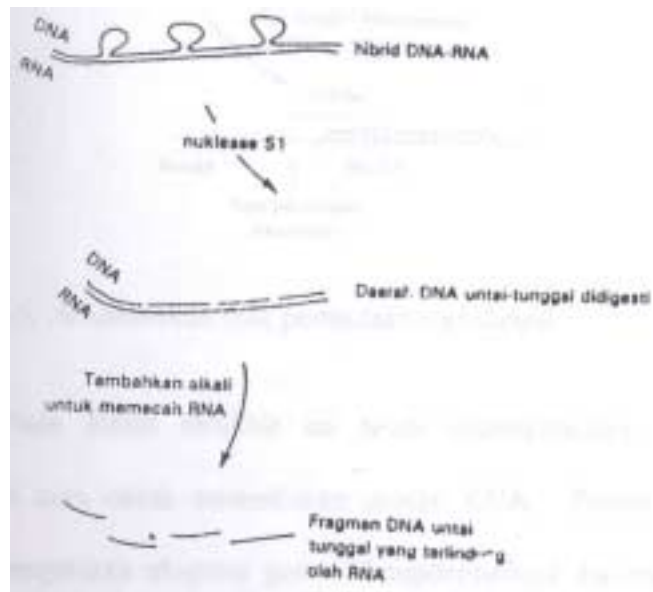
Gambar 3. Gambaran hibrid DNA-RNA antara gen yang mengandung intron

Fragmen DNA untai tunggal yang terlindung dari digesti nuklease S 1 dapat diambil kembali jika untai RNA dipecahkan dengan penambahan alkali.

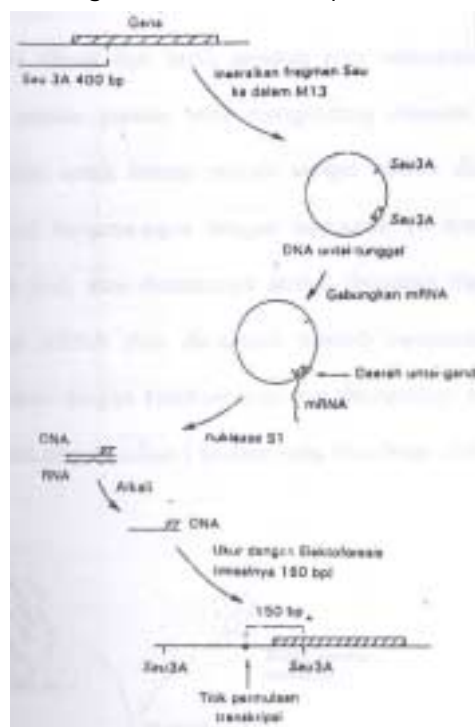
Cara yang digunakan untuk memilih fragmen restriksi yang membatasi gen yang ditunjukkan pada Gambar 5. Fragmen Sau 3A yang mengandung daerah yang membentuk kode 100 bp, bersama dengan urutan leader yang

mendahului gen dengan panjang 300 bp, telah diklon ke dalam vektor M 13 dan didapatkan sebagai molekul untai tunggal. Sampel transkrip RNA ditambahkan dan dibiarkan untuk bergabung dengan molekul DNA. Molekul DNA masih akan merupakan untai tunggal, tetapi sekarang memiliki daerah kecil yang dilindungi oleh transkrip RNA, kecuali daerah yang terlindungi semua akan didigesti oleh nuklease S 1 dan RNA dipecah dengan alkali sehingga meninggalkan sebuah fragmen DNA untai tunggal pendek.

Jika manipulasi tersebut diamati dengan seksama maka akan menjadi jelas bahwa ukuran fragmen untai tunggal ini sesuai dengan jarak antara titik permulaan transkrip dengan tempat Sau 3A sebelah kanan, oleh karena itu ukuran fragmen untai tunggal tersebut ditentukan dengan elektroforesis dan informasi ini digunakan untuk menandai titik permulaan transkrip pada urutan DNA (Brown, 1991).

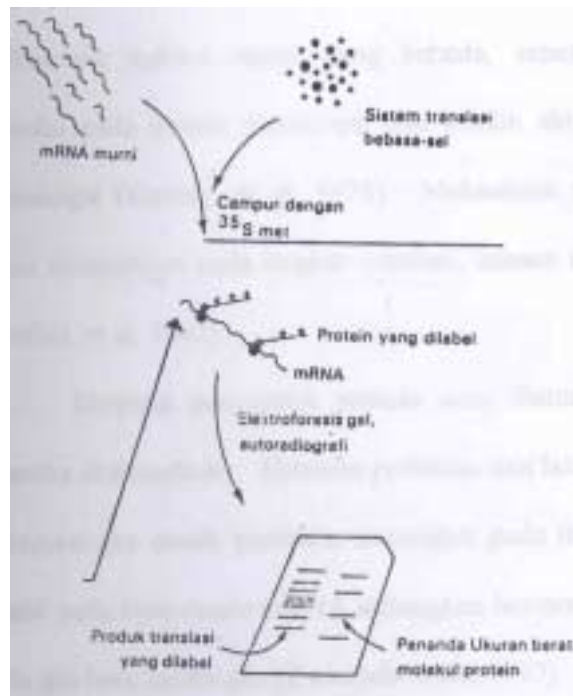


Gambar 4. Pengaruh nukleas S1 pada hibrid DNA-RNA



Gambar 5. Menentukan titik permulaan transkripsi

Pada tahun terakhir ini telah dikembangkan tehnik manipulasi RNA, termasuk cara untuk menentukan urutan RNA. Proses ini memberikan gambaran dalam pengaturan ekspresi gen. Mengidentifikasi dan mempelajari produk translasi gen yang diklonkan. Dua tehnik yang berhubungan yaitu Hybrid-Release Translation (HRT) dan Hybrid-Arrest Translation (HART) digunakan untuk identifikasi produk translasi yang dikode oleh gen yang diklonkan. Keduanya tergantung pada kemampuan mRNA mumi untuk mengarahkan sintesa protein dalam sistem translasi bebas sel (cell-free translation systeme). Sistem tersebut merupakan ekstrak sel yang biasanya dibuat dari benih gandum atau retikulosit kelinci, keduanya sangat aktif dalam sintesis protein serta mengandung ribosom, tRNA dan molekul lain yang diperlukan untuk sintesa protein sampel mRNA ditambahkan pada sistem translasi bebas sel bersama-sama dengan campuran 20 asam amino yang ditemukan pada protein yang satu diantaranya dilabel (biasanya digunakan S32-metionin) molekul-molekul mRNA akan ditranslasi menjadi campuran protein radioaktif yang dapat dipisahkan dengan elektroforesis dan ditunjukkan dengan iutodiograti (Gambal b). Tiap pita menunjukkan 1 protein yang dikodekan oleh salah satu molekul mRNA.



Gambar 6. Translasi babas sel

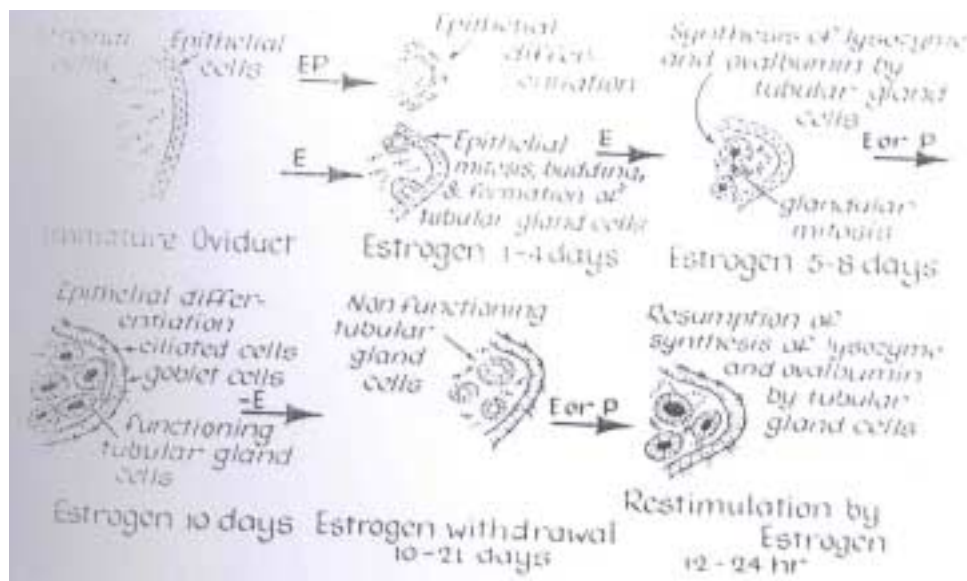
Analisa perbandingan DNA mitokondria pada jenis Gallus berbeda, member gambaran perbedaan pada sekuen antara Gallus gallus seperti Gallus sonnerati, Gallus varius dan Gallus lafayettei berturut-turut adalah 0,9%, 10,5% dan 12,6%. Diasumsikan bahwa laju evolusi mtDNAny adalah 3% per sejuta tahun. Analisis mtDNA ini memberikan informasi tentang hubungan filogenik maternal pada species Gallus (Munehika, et al. 1997). "

Mekanisme hormon pada pengaturan ekspresi gen sel-sel mamalia dipengaruhi oleh aktivitas cAMP, dimana cAMP berhubungan dengan pengaturan sintesa enzim spesifik, seperti halnya pada bakteri. Mekanisme stimulasi sintesa enzim spesifik seperti enzim steroid, hydrocortisone sama halnya dengan hormon polipeptida seperti insulin. Perbedaan struktur dari hormon akan menunjukkan mekanisme induksi enzim yang berbeda, seperti steroid yang diekspresi gennya dimulai pada proses transkripsi dan insulin aktivitasnya dimulai pada tingkat post transkripsi (Kenney, et al. 1973). Mekanisme regulasi dari lipoprotein lipase pada

tikut ditunjukkan pada tingkat translasi, namun tidak ada perubahan pada mRNAnya (Saflari, et al. 1992).

Ekspresi gen untuk protein susu diatur oleh hormon growth factor dan matriks ekstraselluler. Hormon prolaktin dan laktogen teraktifasi pada semua tingkat. Ekspresi gen casein prolaktin meningkat pada tingkat transkripsi beta casein gen dan stabil pada beta casein mRNA sedangkan hormon pertumbuhan (somatotropin) pada alfa dan beta casein gen (Zwierzchowski, 1997).

Regulasi estrogen dan progesteron pada proses diferensiasi dan fungsional dari oviduk ayam terfokus pada sintesa avolbumin. Mulai dari polipeptida tunggal hingga 50% sampai 60% pada akhir diferensiasi. Proses yang dimulai dan perubahan tekanan potensial untuk pemisahan elemen molekul yang menyelubungi sintesa protein spesifik, termasuk polisom spesifik, rRNA dan gen. Langkah-langkah analisa regulasi antara transkripsi dan translasi pada mRNAs spesifik seperti efek dari perkembangan dan variasi hormonal. Untuk lebih jelas dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Interaksi hormon pada perkembangan dan fungsi oviduk ayam

Skema efek estrogen dan progesteron pada perkembangan dan fungsional oviduk ayam, terlihat estrogen (pada ayam muda) mengalami diferensiasi sitoplasma gel-gel kelenjar tubular pada waktu sintesa ovalbumin, di sebut stimulasi primer. Jika diferensiasi terhenti maka sintesa ovalbumin juga terhenti. Ini menunjukkan bahwa gel-gel dalam keadaan tidak aktif disebut stimulasi sekunder. Hal ini akan aktif kembali bila pada ribosom estrogen dan progesteron diproduksi. Namun sebaliknya dapat juga terjadi dimana terbentuknya progesteron dan estrogen akan menghalangi diferensiasi sitoplasma dan akhirnya akan menggagalkan sintesa ovalbumin pada permukaan gel tetapi masing-masing gel tetap mengalami perubahan bentuk (Kenney, et al. 1973)

IV. PENUTUP

Hormon merupakan bahan kimia yang disekresikan ke dalam cairan tubuh oleh satu sel atau sekelompok sel dan dapat mempengaruhi fisiologi sel-sel tubuh. Hormon akan bekerja sesuai dengan reseptornya. Masing-masing reseptor pada sel berbeda-beda, ada yang terdapat pada membran sel, sitoplasma dan inti sel. Di dalam inti akan diekspresikan sesuai dengan cetakan gennya.

Gen merupakan sepotong DNA yang akan menyandikan rantai polipeptida dan RNA. Tidak semua gen diekspresikan secara tepat dalam bentuk polipeptida. Ekspresi gen oleh masing-masing hormon akan menunjukkan tahapan yang berbeda, hal ini tergantung pada struktur hormon tersebut.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T.A. 1991. *Gene cloning an introduction (pengaturan kloning gene)* S.A. Muhammad, dkk. Yayasan Essentia Medica. Yogyakarta
- Glick, B.R. and J.J. Pasternale. 1994. *Molecular Biotechnology Principles and Application of Recombinant DNA*. ASM Pres. New York.
- Guyton, A.C.1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Herrmann, K.M. and R.L. Somerville. 1983. *Amino acid, Biosynthesis ang Genetic Regulation*. By Addison-Wessey Publishing Co. Inc. Canada.
- Kenney, F; B.A. Hamkala; G.Favelulees and J.T. August. 1973. *Gene Expression and its Regulation*. Plenum Press. New York.
- Lehninger, A.L. 1994. *Dasar-dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Mufarid, H. 1997. *Beternak ayam hutan*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Munehika, I; H. Suzuki and S.Wakana. 1997. *Cmperative Analysis of the Restriction Endonuclease Cleavage Pattern of Mitochondrial DNA in the Genus Gallus*. Poultry Science. Japan.
- Safrari, B; J.M. Ong and P.A. Ken. 1992. *Regulation of Adipsa Lipoprotein Lipase Gen Expression by Thyroid Hormone in Rats*. Depart. Of Medicine. Davision of Endocrinology. USA.
- Wiryoehanto, S.D. dan S. Sudardjat. D. 1992. *Aplikasi Kesehatan Hewan*. Hasil Semiloka Biotehnologi Kesehatan Hewan. Direktorat Jenderal Peternakan. Dep. Pertanian. Jakarta.
- Wulangi. K.S. 1989. *Prinsip-prinsip Fisiologi Hewan*. Erlangga. Jakarta.
- Zwierzchowski, L. 1997. *Recent Date ons the regulation of expression of milk Protein Genes*. Proceeding of the Conference Commemorating the 40 th anniversary of the Institute of Genetics and Animal Breeding. Poland.