

KK
KCC
571.9677
Her
K



LAPORAN PENELITIAN
DIK RUTIN UNIVERSITAS AIRLANGGA
TAHUN ANGGARAN 2002

KAJIAN EFEK TERAPI ANTIBODI ANTI-INHIBIN PADA HEWAN SPESIES SAMA TERHADAP TIMBULNYA ANTIBODI ANTI-IDIOTIPIK

Peneliti:

HERRY AGOES HERMADI, M.Si., Drh.
SUWARNO, M.Si., Drh.
KUSNOTO, Drh.



LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Dana DIK Rutin Universitas Airlangga Tahun 2002
SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 4878/JO3/PG/2002

Tanggal 7 Juni 2002

Nomor Urut: 17

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember 2002

LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722) | |
| 3. Puslit Pengembangan Herbal | 7. Puslit Olahraga | 10. Puslit/Kesehatan Reproduksi |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Puslit Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5995346
E-mail: lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian	: Kajian Efek Terapi Antibodi Anti-Inhibin Pada Hewan Spesies Sama Terhadap Timbulnya Antibodi Anti-Idiotipik
a. Macam Penelitian	: <input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Terapan <input type="checkbox"/> Pengembangan
b. Kategori Penelitian	: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III
2. Kepala Poyek Penelitian	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Herry Agoes Hermadi, MSi.,drh.
b. Jenis kelamin	: Laki-Laki
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata Tk. I (Gol. III/d) 131690437
d. Jabatan Sekarang	: Lektor Madya
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Fakultas Kedokteran Hewan
f. Univ./Ins./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Kedokteran Hewan
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 (tiga) orang
4. Lokasi Penelitian	: Lab. Ilmu Kemajiran dan Lab. Virologi & Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Unair
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. A l a m a t	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 6 (enam) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 4.000.000,00 (Empat juta rupiah)
8. Seminar Hasil Penelitian	
a. Dilaksanakan Tanggal	: 11 Maret 2003
b. Hasil Penelitian	: () Baik Sekali (V) Baik () Sedang () Kurang

Surabaya, 11 Maret 2003



Mengetahui/Mengesahkan
a.n. Rektor
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.
NIP 130 701 125



RINGKASAN

KAJIAN EFEK TERAPI ANTIBODI ANTI-INHIBIN PADA HEWAN SPESIES SAMA TERHADAP TIMBULNYA ANTIBODI ANTI-IDIOTIPIK (Herry Agoes Hermadi, Suwarno, dan Kusnoto. 2002: 21 halaman).

Upaya pengembangan populasi dan peningkatan produksi ternak, antara lain dapat dilakukan melalui teknik superovulasi dengan menggunakan preparat hormon PMSG. Namun pada kenyataannya, pemakaian PMSG dalam waktu lama menimbulkan efek samping berupa sistik folikel sebagai akibat stimulasi yang berkepanjangan terhadap ovarium. Sebagai alternatif pengganti hormon PMSG telah banyak dilakukan penelitian dengan menggunakan antibodi anti-inhibin.

Penelitian ini bertujuan: 1) Untuk membuktikan pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik; 2) Untuk membuktikan bahwa pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak menekan jumlah imunoglobulin total.

Sebagai hewan coba digunakan kelinci jantan lokal umur 10 minggu yang diberi perlakuan secara serial menjadi 4 kelompok perlakuan. Kelompok I (serial I), diinjeksi dengan antibodi anti-inhibin pada pengenceran 1 : 10 secara subkutan dengan dosis 0,5 ml/ekor sebanyak satu kali; Kelompok II (serial II) , pada dosis yang sama dengan injeksi sebanyak dua kali; Kelompok III (serial III), sebanyak tiga kali; dan Kelompok IV (serial IV), empat kali. Interval pemberian adalah 2 minggu. Sebelum injeksi berikutnya dilakukan, semua kelinci diambil darahnya untuk pengukuran parameter pada setiap serial. Dua minggu pasca penyuntikan antibodi anti-inhibin dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan terhadap adanya antibodi anti-idiotipik. Pemeriksaan AAIn (sebagai antigen) dilakukan dengan uji ELISA tak langsung, dan pemeriksaa kadar uji imunoglobulin total dilakukan dengan uji ELISA langsung. Data yang terkumpul dianalisis dengan uji Anova untuk pengujian antibodi anti-idiotipik dan jumlah imunoglobulin total, serta uji t untuk pengujian kesamaan antigenik dari *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) rel. 10 for Windows.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian antibodi anti-inhibin kelinci secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik dan tidak menekan kadar imunoglobulin total.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut: 1) Pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies hewan yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik; dan 2) Pemberian antibodi anti-inhibin dari kelinci ke kelinci tidak menekan jumlah imunoglobulin total.

(Lembaga Penelitian, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Nomor Kontrak: 781/J03.2/PG/2002).

KATA PENGANTAR

Upaya pengembangan populasi dan peningkatan produksi ternak, antara lain dapat dilakukan melalui teknik superovulasi dengan menggunakan preparat hormon PMSG. Namun pada kenyataannya, pemakaian PMSG dalam waktu lama menimbulkan efek samping berupa sistik folikel sebagai akibat stimulasi yang berkepanjangan terhadap ovarium. Sebagai alternatif pengganti hormon PMSG telah banyak dilakukan penelitian dengan menggunakan antibodi anti-inhibin.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik; dan membuktikan bahwa pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak menekan jumlah imunoglobulin total.

Atas terselenggaranya penelitian ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Prof. Dr. Med. H. Puruhito, dr., selaku Rektor Universitas Airlangga; Prof. Dr. H. Sarmanu, drh. MS., selaku Ketua Lembaga Penelitian Unair; Dr. Ismudiono, drh., MS., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Unair dan semua pihak yang secara langsung ataupun tidak langsung turut membantu dalam kegiatan penelitian ini dari awal hingga terselesainya laporan ini.

Akhirnya semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan informasi yang berkaitan dengan teknik kultivasi hibridoma. Tentu penelitian ini masih banyak kekurangannya, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaannya.

Surabaya, Desember 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Penelitian	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Hipotesis Penelitian	3
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Inhibin	4
2.2 Antibodi Anti-inhibin	5
2.3 Struktur Immunoglobulin	5
2.4 Epitop pada Immunoglobulin	6
BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	8
3.1 Tujuan Penelitian	8
3.2 Manfaat Penelitian	8
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	9
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	9
4.2 Jenis Penelitian	9
4.3 Sampel Penelitian	9
4.4 Unit Analisis	9
4.5 Variabel Penelitian	9

4.6 Metode Penelitian	10
4.6.1 Pembuatan antibodi anti-inhibin	10
4.6.2 Pemberian perlakuan	10
4.6.3 Pengukuran antibodi anti-idiotipik dengan ELISA tak langsung	11
4.6.4 Pengujian jumlah imunoglobulin total dengan ELISA langsung	11
4.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data	11
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	12
5.1 Hasil Penelitian	12
5.2 Pembahasan	14
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	16
6.1 Kesimpulan	16
6.2 Saran	16
DAFTAR PUSTAKA	17

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Dalam upaya pengembangan populasi dan peningkatan produksi ternak, produktivitas dan penanganan kasus infertilitas menjadi penentu utama. Upaya ini antara lain dapat dilakukan melalui teknik superovulasi, yaitu peningkatan jumlah sel telur, dengan menggunakan preparat hormon *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG). Namun pada kenyataannya, pemakaian PMSG dalam waktu lama menimbulkan efek samping berupa sistik follikel sebagai akibat stimulasi yang berkepanjangan terhadap ovarium.

Sebagai alternatif pengganti hormon PMSG, telah banyak dilakukan penelitian dengan menggunakan antibodi anti-inhibin. Campbell *et al.* (1991) menyatakan bahwa penggunaan antibodi anti-inhibin (AAIn) dosis tinggi mengakibatkan stimulasi pada pertumbuhan folikel ovarium. Antibodi anti-inhibin dapat memicu hipofisis anterior untuk menghasilkan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) endogen, sehingga dapat menumbuhkan follikel pada ovarium (Glencross *et al.*, 1994).

Menurut Kaneko *et al.* (1995) penggunaan AAIn kambing mampu meningkatkan ovulasi dan jumlah anak pada domba, babi dan sapi. Mekanisme terjadinya peningkatan ovulasi dapat diterangkan hampir sama dengan terjadinya peningkatan FSH dan LH endogen. Sementara Hermadi (2001) berhasil meningkatkan jumlah sel telur dan jumlah anak tikus putih setelah pemberian AAIn kelinci dengan dosis 0,2 ml per ekor.

Namun demikian, pemberian AAIn kelinci pada mencit terbukti menimbulkan anti-antibodi (antibodi anti-idiotipik, AAId). Pada pemberian AAIn kelinci sebanyak

dua kali, dapat memicu sistem imun menciit untuk membentuk AAId. Pada kondisi lain, pemberian sebanyak satu kali dapat menekan jumlah imunoglobulin (Ig) total yang bersifat sementara (Hermadi dkk., 2002). Timbulnya AAId ini disebabkan oleh: 1) idiotipik yang berada pada ujung *fragmen antigen binding* (Fab) dari suatu molekul antibodi (pada daerah variabel dari rantai ringan dan rantai berat) dapat bertindak sebagai antigen, sehingga dapat menimbulkan antibodi anti-idiotipik, dan 2) pemberian Ig pada spesies yang berbeda dapat menimbulkan antibodi anti-spesies, sehingga menekan jumlah Ig total.

Menurut Goodman (1996) penyuntikan antibodi ke dalam tubuh resipien yang berlainan jenis dengan donor, akan memicu pembentukan antibodi anti-idiotipik. Hal ini disebabkan struktur antibodi pada bagian Fab dianggap benda asing (*non self*) sehingga timbulah respons imun. Dalam hal ini struktur idiotipik pada ujung Fab akan memiliki struktur yang sama dengan epitop dari suatu molekul antigen. Timbulnya antibodi anti-idiotipik ini menunjukkan adanya perbedaan antara antibodi yang diberikan dengan antibodi resipien. Efek lain yang mungkin timbul adalah terjadinya netralisir terhadap antibodi yang diberikan dan juga timbulnya reaksi antigen antibodi kompleks (antara AAIn dengan AAId).

Pada penelitian ini akan mencoba efek pemberian AAIn pada spesies yang sama, yakni dari kelinci ke kelinci dengan interval waktu 2 minggu. Diharapkan dari hasil penelitian ini dapat menguak waktu timbulnya antibodi anti-idiotipik pada spesies hewan yang sama. Dengan demikian dapat diantisipasi dalam waktu berapa lama pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama tidak menimbulkan AAId.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut.

- 1) Apakah pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) tidak memicu timbulnya antibodi anti-idiotipik?
- 2) Apakah pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) tidak menekan jumlah Ig total?

1.3 Hipotesis Penelitian

Beberapa hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Pemberian antibodi anti-inhibin kelinci pada spesies yang sama dan secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik.
- 2) Pemberian antibodi anti-inhibin kelinci pada spesies yang sama dan secara berulang tidak menekan jumlah Ig total.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Inhibin

Inhibin adalah hormon glikoprotein yang diproduksi oleh sel sertoli dalam tubulus seminiferus dari testis hewan jantan dan sel granulosa dari folikel pada ovarium hewan betina. Inhibin telah diketahui, memiliki berat molekul 32.000 Dalton dan terdiri dari dua ikatan peptida yang disebut sebagai subunit α dan subunit β (Beard *et al.*, 1991).

Pada hewan jantan, inhibin dihasilkan oleh sel sertoli dan melalui umpan balik negatif akan menghambat sekresi FSH dari hipofisa anterior. Sementara, testosteron yang dihasilkan oleh sel leydig akibat pengaruh *luteinizing hormone* (LH) mempunyai umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior, sehingga menghambat sekresi gonadotropin oleh hipofisa anterior (Tomaszewska dkk., 1991).

Pada hewan betina, inhibin yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa dari folikel ovarium akan menghambat sekresi *follicle stimulating hormone* (FSH) melalui umpan balik negatif terhadap hipofisa anterior, sedangkan estradiol dapat bekerja sebagai umpan balik positif pada hipotalamus. Gertakan LH menyebabkan terjadinya ovulasi dan terbentuk korpus luteum. Korpus luteum menghasilkan progesteron yang bekerja sebagai umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior sehingga, pada saat kadar progesteron tinggi di dalam darah, FSH dan LH tidak diproduksi oleh hipofisa anterior. Akibatnya pertumbuhan folikel dan proses ovulasi tidak terjadi sampai pada saat korpus luteum mengalami regresi (Tomaszewska dkk., 1991).

2.2 Antibodi Anti-inhibin

Antibodi anti-inhibin (AAIn) dapat dibuat dengan cara menyuntikkan inhibin pada kelinci, domba, kambing atau hewan lain. Dosis yang dianjurkan adalah 50-1000 µg/ekor. Penyuntikan seringkali dilakukan dengan menambahkan Freund *adjuvant*. Pemanenan antisera dilakukan 10-14 hari pasca penyuntikan (Knight *et al.*, 1988).

Penggunaan AAIN dosis tinggi dapat mendorong terjadinya peningkatan pelepasan FSH dalam darah, sehingga akan merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium, dan selanjutnya menyebabkan sekresi estradiol (Campbell *et al.*, 1991).

Antibodi anti-inhibin dapat digunakan untuk superovulasi, karena dapat memacu hipofisa anterior untuk menghasilkan FSH dan LH, sehingga merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium. Mekanisme terjadinya peningkatan jumlah folikel yang mengalami ovulasi sama dengan terjadinya peningkatan FSH-LH endogen (Glencross *et al.*, 1994; Taya *et al.*, 1996).

2.3 Struktur Immunoglobulin

Imunoglobulin (Ig) merupakan molekul glikoprotein yang mempunyai aktivitas antibodi. Molekul Ig tersusun dari 82-96% polipeptida dan 4-18% karbohidrat. Aktivitas biologik Ig terletak pada komponen polipeptidanya (Subowo, 1993).

Molekul Ig terdiri atas dua rantai berat (*heavy chain*, H) dan dua rantai ringan (*light chain*, L), yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Di dekat ikatan sulfida antar rantai H terdapat bagian Ig yang bersifat lentur yang dinamakan engsel (*hinge*). Pada rantai H atau L terdapat penggal-penggal

rangkaian asam amino yang dipisahkan oleh ikatan sulfida intra-rantai yang disebut *domain*. Pada setiap rantai Ig dibedakan menjadi dua daerah atau regio. Daerah ujung rantai dekat gugus $-NH_2$ susunan asam aminonya beragam dan disebut regio variabel (V), sedangkan daerah ujung dekat gugus $-COOH$ mempunyai susunan asam amino yang relatif tetap disebut regio konstan (C) (Gorman dan Halliwell, 1989; Goodman, 1996).

Berdasarkan struktur rantai H, Ig dibedakan menjadi lima kelas, yakni rantai γ membentuk kelas IgG, rantai μ membentuk kelas IgM, rantai α membentuk kelas IgA, rantai δ membentuk kelas IgD, dan rantai ϵ membentuk kelas IgE. Dalam setiap kelas masih dijumpai subkelas. Pada muncit kelas IgG terdiri dari subkelas IgG1, IgG2a, IgG2b dan IgG3, sedangkan kelas IgM, IgA, IgD dan IgE tidak dibedakan menjadi subkelas. Pada rantai L terdiri dari rantai κ atau λ , dan rantai inilah yang menentukan tipe dan subtipe Ig (Kerr, 1994).

2.4 Epitop pada Immunoglobulin

Molekul Ig memiliki tiga jenis epitop, yaitu isotip, alotip dan idiotip. Isotip merupakan epitop yang menentukan kelas dan subkelas antibodi apabila terletak pada rantai H dari regio C, dan akan menentukan tipe dan subtipe apabila terletak pada rantai L dari regio C. Pemindahan pasif antibodi anti- γ atau antibodi anti- α akan mengganggu produksi IgG atau IgA (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993).

Alotip merupakan epitop yang bersifat polimorfik dan akan diwariskan menurut hukum Mendel. Epitop ini ditemukan tidak pada setiap kelas yang ada dan biasanya terdapat pada regio C. Apabila alotip terdapat pada rantai γ ,

maka setiap alotip merupakan nomenklatur Gm1, Gm2, Gm3 dan sebagainya, sedangkan apabila terletak pada rantai κ , maka alotipnya diberi lambing Km1, Km2 dan sebagainya. Penyuntikan antibodi paternal menyebabkan supresi munculnya molekul Ig yang membawa alotip paternal (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993).

Idiotip merupakan molekul epitop yang terdapat pada regio V yang memberikan cirri khas antibodi tersebut. Oleh karena idiotip merupakan epitop yang terdapat pada daerah pengikat antigen, maka apabila idiotip ini menimbulkan respons imun humoral, struktur spesifisitas antibodi yang terbentuk (anti-idiotip) akan mirip dengan epitop antigen penyebab antibodi pertama. Pemberian antibodi lawan determinan idiotip dapat menekan produksi Ig yang membawa determinan idiotip tertentu (Subowo, 1993; Herscowitz, 1993).

Menurut Poskitt *et al.* (1992) idiotip terdiri dari beberapa idiotop. Idiotop ada yang terletak pada *combining site* dari molekul Ig yang disebut paratop, atau terdapat pada bagian lain dari regio V yang disebut *region framework*. Diperkirakan terdapat 15-20 idiotop pada setiap idiotip dalam satu molekul antibodi, atau satu dari 15-20 reseptor limfosit B memiliki reseptor yang spesifik terhadap idiotop, yang dapat berikatan dengan idiotip antibodi.

BAB 3

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Beberapa tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- 1) Untuk membuktikan pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak dapat memicu pembentukan antibodi anti-idiotipik.
- 2) Untuk membuktikan pemberian antibodi anti-inhibin dari kelinci ke kelinci tidak menekan jumlah imunoglobulin.

3.2 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi lebih lengkap mengenai penggunaan antibodi anti-inhibin sebagai bahan pemicu superovulasi untuk meningkatkan efisiensi reproduksi. Di samping itu juga memberikan sumbangan ilmu pengetahuan bagi perkembangan ilmu di Indonesia, khususnya mengenai pengaruh antibodi anti-inhibin terhadap timbulnya antibodi anti-idiotipik.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama lima bulan, mulai bulan Agustus 2002 sampai Desember 2002, bertempat di Laboratorium Ilmu Kemajira dan di Laboratorium Virologi & Imunologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

4.2 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan rancangan *randomized posttest only control group design* untuk pengujian terhadap antibodi (Zainudin, 2000).

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel berupa kelinci sebanyak 10 ekor yang dikelompokkan secara serial berdasarkan frekuensi injeksi AAIn.

4.4 Unit Analisis

Penelitian ini menggunakan unit analisis berupa antibodi anti-idiotipik (AAId) dalam serum kelinci yang diambil dua minggu pasca injeksi antibodi anti-inhibin (AAIn) pada frekuensi 1 kali, 2 kali, 3 kali, dan 4 kali.

4.5 Variabel Penelitian

Sebagai variabel kendali dalam penelitian adalah umur dan asal kelinci. Sebagai variabel bebas adalah antibodi anti-inhibin (AAIn). Sebagai variabel tergantung adalah antibodi anti-idiotipik (AAId) dalam serum kelinci, yang

diukur dengan uji ELISA tak langsung dan kadar imunoglobulin total dengan uji ELISA langsung.

4.6 Metode Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi lima tahap sebagai berikut.

4.6.1 Pembuatan antibodi anti-inhibin

Antibodi anti-inhibin dibuat dengan cara menyuntikkan inhibin pada 5 ekor kelinci dengan dosis 50 µg/ekor sebanyak 5 kali dengan interval waktu satu minggu. Tiga minggu setelah penyuntikan terakhir dilakukan pengambilan serum untuk penentuan titer antibodi berdasarkan teknik ELISA tak langsung (Harlow dan Lane, 1988).

4.6.2 Pemberian perlakuan

Sebagai hewan coba digunakan kelinci jantan lokal umur 10 minggu yang diberi perlakuan secara serial menjadi 4 kelompok perlakuan. Kelompok I (serial I), diinjeksi dengan antibodi anti-inhibin pada pengenceran 1 : 10 secara subkutan dengan dosis 0,5 ml/ekor sebanyak satu kali; Kelompok II (serial II), pada dosis yang sama dengan injeksi sebanyak dua kali; Kelompok III (serial III), sebanyak tiga kali; dan Kelompok IV (serial IV), empat kali. Interval pemberian adalah 2 minggu. Sebelum injeksi berikutnya dilakukan, semua kelinci diambil darahnya untuk pengukuran parameter pada setiap serial.

4.6.3 Pengukuran antibodi anti-idiotipik dengan ELISA tak langsung

Dua minggu pasca penyuntikan antibodi anti-inhibin dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan terhadap adanya antibodi anti-idiotipik. Pemeriksaan dilakukan dengan uji ELISA tak langsung dengan cara mereaksikan AAI_n (sebagai antigen) pada pengenceran 1:1000 dengan AAId pada pengenceran 1:100, menggunakan konjugat *goat anti-rabbit Ig G* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase (Harlow dan Lane, 1988). Sebagai kontrol uji digunakan serum mencit normal (SMN), serum ayam normal (SAN), dan fosfat bufer salin (PBS).

4.6.4 Pengujian jumlah imunoglobulin total dengan ELISA langsung

Dua minggu pasca penyuntikan AAI_n pada setiap frekuensi dilakukan pemeriksaan jumlah Ig total. Imunoglobulin (serum kelinci) perlakuan *di-coating* pada mikroplat dengan pengenceran 1 : 1000. Konjugat yang digunakan adalah *goat anti-rabbit IgG* yang dilabel dengan enzim alkalin fosfatase (Harlow dan Lane, 1988). Sebagai kontrol uji digunakan imunoglobulin dari SMN, SAN, dan PBS.

4.7 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *posttest only control group design* (Zainuddin, 2000). Data yang terkumpul berupa kadar antibodi anti-idiotipik dan kadar imunoglobulin total dianalisis dengan uji Anova yang dilanjutkan dengan uji Duncan's (5%) dari *statistical product and service solutions* (SPSS) rel. 11.0 for Windows (Santoso, 2001).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Pada penelitian ini hasil pengukuran kadar AAId pasca injeksi berulang dengan AAIn pada uji ELISA tak langsung dapat dilihat pada Tabel 5.1. Pada Tabel 5.1 nilai OD dari pengukuran kadar AAId setelah injeksi berulang dengan AAIn berturut-turut adalah $1,461 \pm 0,019$ (kelompok kontrol, tanpa injeksi AAIn); $1,461 \pm 0,021$ (injeksi 1 kali); $1,462 \pm 0,021$ (injeksi 2 kali); $1,460 \pm 0,017$ (injeksi 3 kali); dan $1,464 \pm 0,026$ (injeksi 4 kali). Sementara pada kelompok kontrol uji dengan memeriksa antibodi atau serum mencit normal (SMN) menunjukkan nilai $1,443 \pm 0,013$ dan serum ayam normal (SAN) sebesar $1,434 \pm 0,020$ serta pada PBS menghasilkan nilai sebesar $0,013 \pm 0,003$. Secara statistik antara kelima perlakuan tidak menunjukkan adanya perbedaan ($p > 0,05$) baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan.

Tabel 5.1 Nilai OD dan Transformasi Pengukuran Kadar AAId (Pasca Injeksi Berulang dengan AAIn) pada Uji ELISA Tak-langsung

Frekuensi injeksi AAIn	Kadar AAId	
	<i>Optical density (OD)</i>	Transformasi <i>V_y</i>
Tanpa injeksi AAIn	$1,461 \pm 0,019$	$1,209 \pm 0,008$
Injeksi AAIn 1 kali	$1,461 \pm 0,021$	$1,209 \pm 0,009$
Injeksi AAIn 2 kali	$1,462 \pm 0,021$	$1,209 \pm 0,009$
Injeksi AAIn 3 kali	$1,460 \pm 0,017$	$1,208 \pm 0,007$
Injeksi AAIn 4 kali	$1,464 \pm 0,026$	$1,209 \pm 0,011$
Serum mencit normal (SMN)	$1,443 \pm 0,013$	-
Serum ayam normal (SAN)	$1,434 \pm 0,020$	-
<i>Phosphate buffer saline (PBS)</i>	$0,013 \pm 0,003$	-

AAIn: antibodi anti-inhibin; AAId: antibodi anti-idotipik

Pada Tabel 5.2 ditunjukkan hasil pengukuran jumlah imunoglobulin (Ig) total kelinci pasca injeksi berulang dengan AAIn pada uji ELISA langsung. Nilai OD yang terbaca dari jumlah Ig total kelinci tanpa pemberian AAIn sebesar $1,458 \pm 0,027$, satu kali sebesar $1,457 \pm 0,026$, dua kali sebesar $1,464 \pm 0,021$, tiga kali sebesar $1,469 \pm 0,023$ dan empat kali sebesar $1,464 \pm 0,026$. Sementara jumlah Ig total pada SMN menunjukkan nilai OD sebesar $0,042 \pm 0,008$, SAN sebesar $0,041 \pm 0,005$, dan PBS sebesar $0,010 \pm 0,002$.

Pada penelitian ini injeksi AAIn pada spesies yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara statistik tidak menunjukkan perbedaan ($p > 0,05$) terhadap penekanan jumlah imunoglobulin total, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan.

Tabel 5.2 Nilai OD dan Transformasi Pengukuran Jumlah Imunoglobulin Total (Pasca Injeksi Berulang dengan AAIn) pada Uji ELISA Langsung

Frekuensi injeksi AAIn	Kadar AAId	
	<i>Optical density (OD)</i>	Transformasi V_y
Tanpa injeksi AAIn	$1,458 \pm 0,027$	$1,207 \pm 0,011$
Injeksi AAIn 1 kali	$1,457 \pm 0,026$	$1,207 \pm 0,011$
Injeksi AAIn 2 kali	$1,464 \pm 0,021$	$1,210 \pm 0,009$
Injeksi AAIn 3 kali	$1,469 \pm 0,023$	$1,212 \pm 0,009$
Injeksi AAIn 4 kali	$1,464 \pm 0,026$	$1,210 \pm 0,011$
Serum mencit normal (SMN)	$0,042 \pm 0,008$	-
Serum ayam normal (SAN)	$0,041 \pm 0,005$	-
<i>Phosphate buffer saline (PBS)</i>	$0,010 \pm 0,002$	-

AAIn: antibodi anti-inhibin; AAId: antibodi anti-idotipik

5.2 Pembahasan

Pada penelitian ini, pemberian AAIn pada spesies hewan yang sama (dari kelinci ke kelinci) tidak menunjukkan adanya pembentukan AAId ataupun penekanan terhadap kadar imunoglobulin total, baik pada kelompok kontrol (tanpa injeksi) maupun kelompok perlakuan yang diinjeksi sebanyak satu sampai empat kali. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat kesamaan antara antibodi / serum donor yang mengandung AAIn dengan serum resipien. sehingga antibodi donor (AAIn) tidak dianggap sebagai benda asing (*non-self*) oleh resipien.

Imunoglobulin kelinci memiliki berat molekul 140-900 kDa yang merupakan imunogen kuat di dalam memicu timbulnya AAId. Pemberian AAIn kelinci pada mencit telah terbukti dapat memicu pembentukan AAId. Pemberian sebanyak satu kali sudah mampu memicu pembentukan AAId dan menekan jumlah imunoglobulin total (Hermadi dkk., 2002). Pada spesies hewan yang sama perbedaan struktur imunoglobulin tidak terletak pada struktur idiotipik, tetapi mungkin pada struktur isotipik (perbedaan sub-klas/klas dan sub-tipe/tipe) atau pada struktur alotipik (perbedaan pada sub-klas tertentu) (Butler *et al.*, 1987; Gorman dan Halliwell, 1989). Namun demikian pemindahan antibodi secara pasif dengan isotipik dan alotipik berbeda hanya akan mengganggu produksi imunoglobulin yang bersifat sementara (Hercowitz, 1993; Subowo, 1993). Pada spesies yang berbeda pemberian imunoglobulin dari kelinci ke mencit akan menimbulkan antibodi terhadap γ -globulin, rantai H + (A, G, M) + L, rantai H + L IgG, rantai H IgG, Fab'₂ IgG, rantai H IgA, Ig A + *secretory component*, rantai H + L IgM, rantai H IgM dan terhadap rantai L (Gorman dan Halliwell, 1989; Kerr, 1994).

Pada penelitian ini tidak adanya pengaruh pemberian AAIn terhadap pembentukan AAId ataupun penekanan terhadap kadar imunoglobulin, justru memiliki beberapa keuntungan. Pertama, pemberian AAIn dapat dimanfaatkan sebagai preparat yang mampu meningkatkan jumlah sel telur atau dengan kata lain dapat dimanfaatkan sebagai preparat superovulasi non-hormonal. Kedua, AAIn dapat menetralkan inhibin dalam tubuh hewan betina, sehingga hambatan terhadap sekresi FSH oleh inhibin melalui umpan balik negatif terhadap hipofisa anterior dapat dihindari. Ketiga, dari segi kesehatan dan ekonomis lebih menguntungkan, karena tidak adanya efek hormonal dan harganya jauh lebih murah dibandingkan dengan preparat hormon.

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan beberapa hal sebagai berikut.

- 1) Pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies hewan yang sama (dari kelinci ke kelinci) secara berulang tidak memicu pembentukan antibodi anti-idioipik.
- 2) Pemberian antibodi anti-inhibin dari kelinci ke kelinci tidak menekan jumlah imunoglobulin total.

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disarankan beberapa hal sebagai berikut: 1) pemberian antibodi anti-inhibin pada spesies yang sama tidak menyebabkan timbulnya antibodi anti-idiotipik sampai pada pemberian yang keempat; 2) antibodi anti-inhibin dapat digunakan sebagai alternatif untuk tujuan superovulasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 1997. Cellular and Molecular Immunology. Saunders Company.
- Beard, AJ., N. Groome, and PG. Knight. 1991. Estimation of immunoreactive (IR) inhibin concentration in bovine ovarian follicle using a level 2-site immunoradiometric assay (IRMA) specific for dimeric inhibin. *J. Reprod. Fertil.* 40: 25.
- Butler, JE., H. Heyermann, M. Borca, M. Bielecka, and LV. Frenyo. 1987. The isotypic, allotypic and idiotypic heterogeneity of bovine. *In: Veterinary Immunology and Immunopathology.* 17: 1-16.
- Campbell, BK., RJ. Scaramuzzi, BM. Gordon, CG. Tsonis, and JA. Downing. 1991. Immunization against inhibin increases FSH level, oestradiol secretion and follicular development. *J. Reprod. Fertil.* Abstract.
- Findlay, JK., BW. Doughton, CG. Tsonis, RW. Brown, JW. Hungerford, PE. Greenwood, and RG. Forage. 1993. Inhibin as a fecundity vaccine. *J. Anim. Reprod. Sci.* 33: 324-325.
- Glencross, RG., ECL. Bleach, SC. Wood, and PG. Knight. 1994. Active immunization of heifers against inhibin, effect on plasma concentration of gonadotropin, steroid and ovarian follicular dynamics during prostaglandin synchronized cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100: 599-605.
- Goodman, JW. 1996. Immunoglobulin structure and function. *In: Basic and Clinical Immunology.* 7th ed. A Lange Medical Book. Prentice Hall International, Inc. (UK) Limited. London.
- Gorman, NT., and REW. Halliwell. 1989. The immunoglobulins: structure, genetics, and function. *In: Veterinary Clinical Immunology.* WB. Saunders Company, Philadelphia. pp. 19-54.
- Harlow, E. and D. Lane. 1988. *Antibodies. A Laboratory Manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hermadi, HA. 2001. Uji potensi biologis antibodi poliklonal anti-inhibin pada tikus putih. Thesis. Pascasarjana, Unair. Surabaya.
- Hermadi, HA., Suwarno, dan Kusnoto. 2002. Pengaruh pemberian antibodi anti-inhibin terhadap timbulnya antibodi anti-idiotipik pada mencit *Media Kedokteran Hewan*, 18(1): 130-134.
- Herscovitz, MB. 1993. Imunofisiologi: Fungsi sel dan interaksi seluler dalam pembentukan antibodi. *Dalam: Imunologi III.* JA. Bellanti. Gajah Mada University Press, Yogyakarta. 126-172.
- Janeway, C.A. Jr., P. Travers, M. Walport, and J.D. Capra. 1999. *Immunobiology. The immune system in health and disease.* 4th ed. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing. New York, US.

- Kaneko, H., Y. Nakanishi, S. Akagi, K. Arai, K. Taya, G. Watanabe, S. Sasamoto, and Y. Hasegawa. 1995. Immunoneutralization of inhibin and oestradiol during the follicular phase of the oestrous cycle in cows. *Biol. Reprod.*
- Kerr, MA. 1994. Antibodies recognizing immunoglobulins. *In: Immunochimistry.* MA. Kerr and R. Troope (Eds). Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. pp. 43-62.
- Knight, PG., AJ. Beard, JHM. Wrathall, and RJ. Castillo. 1988. Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin α subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J. Molecular Endocrinology.* 2: 189-200.
- Poskitt, D., M. Killing, B. Jean-Francois, S. Turnbull, L. MacDonald, and D. Yasmeen. 1992. Anti-idiotypic vaccines in theory and practice. *Today's Life Science.* 4: 44-49.
- Santoso, S. 2001. *Mengolah Data Statistik Secara Profesional.* SPSS versi 10. Penerbit PT. Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Subowo, 1993. *Imunobiologi.* Penerbit Angkasa Bandung. Hal. 75-89.
- Taya, K., H. Kaneko, T. Takedomi, H. Kishi, and G. Watanabe. 1996. Role of inhibin in regulation of FSH secretion on folliculogenesis in cows. *J. Anim. Reprod. Sci.* 42: 563-570.
- Tomaszewska, MW., IK. Utama, IG. Putu, dan TD. Chaniago. 1991. *Reproduksi Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia.* PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Wigzell, H. 1987. Regulation of immunity by anti idiotypic antibodies. *In: Vet. Immunology and Immunopathology.* 17: 1-16.
- Zainuddin, M. 2000. *Metodologi Penelitian.* Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.

Summarize

Case Processing Summary^a

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Kadar AAId (indirect) * Trial	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%
Transformasi Vyi * Trial	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%
Kadar Ig (direct) * Trial	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%
Transformasi Vyd * Trial	40	100.0%	0	.0%	40	100.0%

a. Limited to first 100 cases.

Case Summaries^a

			Kadar AAId (indirect)	Transformasi Vyi	Kadar Ig (direct)	Transformasi Vyd
Trial	Kontrol	1	1.4390	1.200	1.440	1.200
		2	1.4630	1.210	1.430	1.196
		3	1.4480	1.203	1.448	1.203
		4	1.4330	1.197	1.441	1.200
		5	1.4850	1.219	1.496	1.223
		6	1.4740	1.214	1.486	1.219
		7	1.4630	1.210	1.488	1.220
		8	1.4810	1.217	1.435	1.198
	Total	N	8	8	8	8
		Sum	11.6860	9.670	11.664	9.659
		Mean	1.460750	1.20875	1.45800	1.20743
		Std. Deviation	.0192335	.008031	.027135	.011215
	Injeksi	1x	1	1.4380	1.199	1.441
2			1.4530	1.205	1.477	1.215
3			1.4440	1.202	1.450	1.204
4			1.4350	1.198	1.435	1.198
5			1.4900	1.221	1.417	1.190
6			1.4790	1.216	1.481	1.217
7			1.4710	1.213	1.487	1.219
8			1.4800	1.217	1.475	1.214
Total		N	8	8	8	8
		Sum	11.6900	9.671	11.663	9.659
		Mean	1.461250	1.20887	1.45787	1.20738
		Std. Deviation	.0213257	.008935	.025587	.010611
Injeksi		2x	1	1.4360	1.198	1.443
	2		1.4640	1.210	1.447	1.203
	3		1.4420	1.201	1.448	1.203
	4		1.4380	1.199	1.442	1.201
	5		1.4970	1.224	1.482	1.217
	6		1.4740	1.214	1.484	1.218
	7		1.4680	1.212	1.492	1.221
	8		1.4740	1.214	1.475	1.214

				Kadar AAId (indirect)	Transformasi Vyi	Kadar Ig (direct)	Transformasi Vyd
Trial	Injeksi 2x	Total	N	8	8	8	8
			Sum	11.6930	9.672	11.713	9.680
			Mean	1.461625	1.20900	1.46413	1.20998
			Std. Deviation	.0213938	.009024	.021040	.008691
Injeksi 3x	1 2 3 4 5 6 7 8	Total	N	8	8	8	8
			Sum	11.6790	9.667	11.752	9.696
			Mean	1.459875	1.20838	1.46900	1.21199
			Std. Deviation	.0165222	.006718	.022885	.009446
			1	1.4370	1.199	1.436	1.198
			2	1.4600	1.208	1.468	1.212
			3	1.4450	1.202	1.428	1.195
			4	1.4340	1.197	1.440	1.200
			5	1.4790	1.216	1.496	1.223
Injeksi 4x	1 2 3 4 5 6 7 8	Total	N	8	8	8	8
			Sum	11.7120	9.679	11.710	9.679
			Mean	1.464000	1.20988	1.46375	1.20981
			Std. Deviation	.0259340	.010816	.025672	.010621
			1	1.4370	1.199	1.436	1.198
			2	1.4600	1.208	1.468	1.212
			3	1.4450	1.202	1.428	1.195
			4	1.4340	1.197	1.440	1.200
			5	1.4790	1.216	1.496	1.223
Total	N	Total	N	40	40	40	40
			Sum	58.4600	48.359	58.502	48.373
			Mean	1.461500	1.20897	1.46255	1.20932
			Std. Deviation	.0200461	.008359	.023653	.009783

a. Limited to first 100 cases.

PAMERAN

718 NOV 2005

Oneway

21

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Transformasi Vyi	Between Groups	.000	4	.000	.032	.998
	Within Groups	.003	35	.000		
	Total	.003	39			
Transformasi Vyd	Between Groups	.000	4	.000	.293	.880
	Within Groups	.004	35	.000		
	Total	.004	39			

Post Hoc Tests

Homogeneous Subsets

Transformasi Vyi

Duncan^a

Trial	N	Subset for alpha = .05
		1
Injeksi 3x	8	1.20838
Kontrol	8	1.20875
Injeksi 1x	8	1.20888
Injeksi 2x	8	1.20900
Injeksi 4x	8	1.20988
Sig.		.765

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

Transformasi Vyd

Duncan^a

Trial	N	Subset for alpha = .05
		1
Injeksi 1x	8	1.20738
Kontrol	8	1.20743
Injeksi 4x	8	1.20981
Injeksi 2x	8	1.20998
Injeksi 3x	8	1.21199
Sig.		.427

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.