

SKRIPSI

**PENGARUH PENYUNTIKAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-INHIBIN
TERHADAP JUMLAH SEL TELUR TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**



Oleh :

MUHAMMAD MUFIDUL KHOIR
GRESIK - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

SKRIPSI

PENGARUH PENYUNTIKAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-INHIBIN TERHADAP JUMLAH SEL TELUR TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*)

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh
Gelar Sarjana Kedokteran Hewan
pada
Fakultas Kedokteran Hewan - Universitas Airlangga

Oleh :

MUHAMMAD MUFIDUL KHOIR
GRESIK - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2001**

**PENGARUH PENYUNTIKAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-INHIBIN
TERHADAP JUMLAH SEL TELUR TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*)**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

SARJANA KEDOKTERAN HEWAN

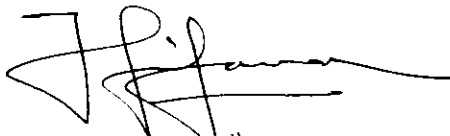
Pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh:

MUHAMMAD MUFIDUL KHOIR
NIM: 069512208

Menyetujui
Komisi Pembimbing



Husni Anwar, Drh.

Pembimbing Pertama



Iwan Willyanto, M.Sc., Ph.D., Drh.

Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar **SARJANA KEDOKTERAN HEWAN**.

Menyetujui
Panitia Penguji,



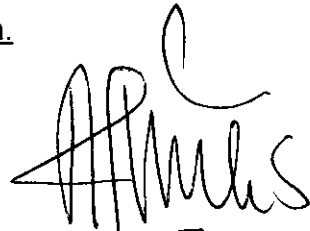
Adi Prijo Rahardjo, Drh.

Ketua



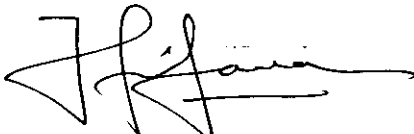
Widjiati, M.Si., Drh.

Sekretaris



Abdul Samik, M.Si., Drh.

Anggota



Husni Anwar, Drh

Anggota




Iwan Willyanto, M.Sc., Ph.D., Drh

Anggota

Surabaya, 18 Mei 2001

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga
Besan,



DR. Idrisdiono, M. S., Drh

NIP.130687297

**PENGARUH PENYUNTIKAN ANTIBODI POLIKLONAL ANTI-INHIBIN
TERHADAP JUMLAH SEL TELUR TIKUS PUTIH**

(Rattus norvegicus)

MUHAMMAD MUFIDUL KHOIR

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan antibodi poliklonal anti-inhibin terhadap jumlah sel telur yang diovulasikan. Pembuatan antibodi poliklonal anti-inhibin menggunakan tujuh ekor kelinci jantan. Kelinci-kelinci tersebut diberi perlakuan dengan cara menyuntikkan 500 µg secara sub cutan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin sebanyak lima kali dengan selang waktu penyuntikan tujuh hari. Penyuntikan pertama menggunakan *Freund's Complete Adjuvant* dan penyuntikan kedua sampai kelima menggunakan *Freund's Incomplete Adjuvant*. Pada hari ke-21 dan ke-35 diperiksa titer antibodi poliklonal anti-inhibin dengan menggunakan metode uji ELISA tidak langsung. Uji efektivitas digunakan tikus betina sebanyak 40 ekor, dibagi menjadi lima kelompok perlakuan masing-masing terdiri dari delapan ulangan, yaitu kelompok kontrol (P0) yang diberi NaCl fisiologis dan kelompok perlakuan yang diberi antibodi poliklonal anti-inhibin pengenceran 1/10 (P1); 1/20 (P2); 1/40 (P3) dan 1/80 (P4) dengan titer 20.480. Penyuntikan dilakukan pada fase proestrus dan dosis yang digunakan adalah 0,2 ml, kemudian dikawinkan dengan pejantan yang sudah dikastrasi. Delapan jam kemudian dilakukan *flusing* (pemanenan) sel telur dengan cara merobek kantong fertilisasi. Data yang diperoleh diuji dengan uji F dan bila terjadi perbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji BNT. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penyuntikan pada pengenceran 1/80 dari antibodi poliklonal anti-inhibin dengan titer 20.480 masih dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovulasikan ($P < 0,01$). Sedangkan penyuntikan pada pengenceran 1/10 dari antibodi poliklonal anti-inhibin dengan titer 20.480 merupakan dosis terbaik yang memberikan respon tertinggi terhadap peningkatan jumlah sel telur.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allaw SWT atas segala limpahan rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan makalah yang berjudul **Pengaruh Penyuntikan Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin Terhadap Jumlah Sel Telur Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)**.

Seiring dengan meningkatnya jumlah penduduk Indonesia, kebutuhan akan protein hewani sebagai salah satu sumber gizi yang utama akan semakin meningkat. Untuk memenuhi kebutuhan akan protein hewani tersebut, di Indonesia berbagai penelitian guna meningkatkan produktifitas ternak telah banyak dilakukan, terutama dalam hal peningkatan jumlah populasi ternak. Salah satunya dengan jalan melakukan superovulasi. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui pengaruh hormon-hormon reproduksi terhadap peningkatan jumlah sel telur. Salah satunya seperti yang penulis lakukan, dan hasilnya disajikan dalam makalah ini.

Pada kesempatan ini, dengan penuh rasa hormat penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Dr. Ismudiono, M.S.,Drh., selaku dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Husni Anwar, Drh. selaku pembimbing pertama dan Bapak Iwan Willyanto, M.Sc., Ph.D., Drh. selaku pembimbing kedua yang telah bersedia meluangkan waktunya dalam memberikan saran serta nasihat demi kesempurnaan penyusunan makalah ini. Demikian pula kepada Bapak Herry Agoes Hermadi, M.Si., Drh. yang telah memberikan dukungan pembiayaan dan Ibu Widjiati,

M.Si., Drh., Bapak Dr. Fedik Abdul Rantam, Drh., Bapak Suwarno, M.Si., Drh., Bapak Abdul Samik M.Si. Drh., Bapak Mas'ud Heriadi, M.Phil., Ph.D., Drh., serta Bapak Imam Suryanto, M.Kes., Drh. yang telah memberikan nasihat dan bimbingan demi terselesaikannya penelitian ini.

Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Bapak, Ibu, Mbak Elok, Mas Hasan serta adik-adik tercinta atas dorongan semangat dan do'a yang senantiasa tercurah kepada penulis sampai saat ini. Juga kepada Mas Cipto, Mas Chris, Mbak Helen, Pak Khusein, Mas Pomo, Rahmad Widiyarto, Naim, Warga Pokil Club, Soni bersaudara, serta seluruh teman-teman angkatan '95 yang telah memberikan bantuan saran dan kritik, semoga amal dan kebaikannya mendapat imbalan yang setimpal dari Allah SWT.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mohon saran dan kritik dari para pembaca demi kesempurnaan makalah ini. Semoga makalah ini berguna bagi perkembangan ilmu dan pengetahuan, khususnya di bidang kedokteran hewan. Amin.

Surabaya, Maret 2001

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Perumusan Masalah.....	3
1.3. Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4. Hipotesis Penelitian	4
1.5. Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Siklus Birahi	6
2.1.1. Faktor Yang Mempengaruhi Siklus Birahi.....	7
2.1.2. Mekanisme Siklus Birahi	7
2.1.3. Siklus Birahi Pada Tikus	9
2.2. Pertumbuhan Dan Perkembangan Folikel.....	11
2.3. Ovulasi.....	12

2.4.	Struktur Kimia Dan Mekanisme Kerja Inhibin	13
2.5.	Respon Imun.....	15
2.6.	Antigen Dan Imunogen	16
2.7.	Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin.....	17
BAB III.	MATERI DAN METODE.....	19
3.1.	Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.2.	Materi Penelitian	19
3.3.	Metode Penelitian.....	21
3.4.	Parameter Pengamatan	25
3.5.	Rancangan Penelitian dan Analisis Data.....	25
BAB IV.	HASIL PENELITIAN.....	26
4.1.	Produksi Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin.....	26
4.2.	Uji Efektifitas	28
BAB V.	PEMBAHASAN.....	30
5.1.	Produksi Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin.....	30
5.2.	Uji Efektifitas	33
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
6.1.	Kesimpulan.....	37
6.2.	Saran.....	37
	RINGKASAN.....	38
	DAFTAR PUSTAKA	40
	LAMPIRAN.....	44

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Pemeriksaan Uji ELISA Pada Pembacaan 15 Menit Setelah Tiga Kali Penyuntikan.....	27
2. Hasil Pemeriksaan Uji ELISA Pada Pembacaan 15 Menit Setelah Lima Kali Penyuntikan.....	27
3. Rata-rata Jumlah Sel Telur Tikus Putih Setelah Disuntik Ab. Po. Anti-Inhibin	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar:	Halaman
1. Alat-alat Untuk <i>Flushing</i> Sel Telur Tikus	20
2. Jadwal Penyuntikan Produksi Ab. Po. Anti-Inhibin Pada Kelinci	23
3. Pengambilan Darah Kelinci Secara Intra Cardial.....	23
4. Jadwal Pelaksanaan Panen Sel Telur.....	24
5. Uterus dan Tuba Fallopii Tikus Setelah Terjadi Perkawinan.....	25
6. Kantong Fertilisasi.....	25
7. Inhibin Dengan Berat Molekul 32 kDa. Pada Sapi	26
8. Diagram Batang Titer Ab. Po. Anti-Inhibin yang Masih Menunjukkan Nilai Positif Pada Tabel 1 dan 2	28
9. Diagram Batang Rata-rata Jumlah Sel Telur Tikus yang Dipanen Antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Ab. Po. Anti-Inhibin.....	29
10. Sel Telur Tikus yang Dibungkus Oleh Sel Kumulus yang Masih Kompak.....	29

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Cara Kerja SDS-PAGE.....	45
2. Cara Kerja ELISA Indirek.....	47
3. Sidik Ragam Hasil Penghitungan Jumlah Sel Telur	49
4. Data Biologis Tikus Putih.....	51

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang masalah

Kebutuhan akan protein hewani dirasakan sangat perlu, terutama bagi anak-anak dimana protein akan sangat berpengaruh bagi pertumbuhan dan kecerdasannya. Seiring dengan semakin meningkatnya jumlah penduduk di Indonesia, pengembangan usaha peternakan perlu diupayakan peningkatannya baik secara kualitas maupun kuantitas, mengingat tingkat produktifitas ternak di Indonesia masih rendah. Salah satu faktor yang sangat terkait dalam pengembangan bidang usaha peternakan di Indonesia adalah tingkat reproduksi hewan.

Penampilan reproduksi menjadi penentu utama bagi keberhasilan produksi ternak tersebut. Dalam hal ini kesuburan hewan betina merupakan salah satu segi yang perlu diusahakan seoptimal mungkin agar diperoleh penampilan reproduksi yang lebih baik.

Menurut Hardjopranjoto (1992), dalam pengembangan populasi dan peningkatan ternak, perlu diperhatikan penampilan reproduksi yang akan menjadi penentu utama bagi keberhasilan produktivitas dan peningkatan mutu genetik keturunannya, upaya ini dapat dilakukan dengan jalan peningkatan efisiensi reproduksi. Melalui manipulasi siklus birahi, meningkatkan mutu genetik anak dengan kawin suntik, superovulasi dan sinkronisasi birahi dilapangan (Mahaputra,

1992). Menurut Toelihere (1981), untuk menambah jumlah ovulasi dalam satu siklus birahi normal dilakukan dengan jalan superovulasi.

Seperti diketahui, untuk melakukan superovulasi di lapangan selama ini digunakan preparat hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) yang mempunyai daya kerja merangsang terbentuknya folikel ovarium dan meningkatkan kadar estrogen darah. Efek ini identik dengan fungsi hormon *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Mc. Donald, 1977).

Namun kenyataannya pemakaian PMSG dalam waktu lama menimbulkan efek samping yaitu berupa sistik folikel sebagai akibat stimulasi yang berkepanjangan terhadap ovarium. Keberadaan sistik folikel berdampak pada birahi yang berkepanjangan (Amstrong, *et al.*, 1982). Untuk itu perlu dicarikan alternatif pengganti dari hormon tersebut. Pada tahun 1985 – 1986 Robertson *et al.* sebagaimana dikutip oleh Knight *et al.* (1990) dalam sebuah penelitiannya berhasil memisahkan inhibin dari cairan folikel sapi dengan ukuran molekul 32 kDa. Inhibin bekerja menghambat pelepasan FSH dari hipofisa anterior tanpa mempengaruhi pelepasan *Luteinizing Hormone* (LH), (Ismudiono, 1996).

Salah satu masalah menarik yang perlu di ketahui dalam bidang reproduksi ini adalah bagaimana menghambat kerja inhibin, sehingga tidak terjadi hambatan pelepasan FSH dari hipofisa anterior. Menurut Campbell *et al.* (1991) penggunaan antibodi anti-inhibin pada konsentrasi yang tinggi mengakibatkan peningkatan kadar FSH dalam darah sehingga merangsang pertumbuhan folikel ovarium dan sekresi oestradiol. Inhibin dapat digunakan sebagai antigen untuk

menimbulkan antibodi pada tubuh hewan dalam bentuk antibodi poliklonal anti-inhibin (Hinshelwood *et al.*, 1991). Antibodi poliklonal anti-inhibin dapat digunakan untuk superovulasi karena memacu hipofisa anterior untuk menghasilkan FSH dan LH endogen sehingga dapat merangsang pertumbuhan folikel pada ovarium.

Pada penelitian ini dilakukan produksi antibodi poliklonal anti-inhibin dari serum kelinci yang sebelumnya diimunisasi dengan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin, selain itu menguji efektifitas antibodi poliklonal anti inhibin terhadap jumlah sel telur yang diovulasikan pada tikus putih.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka permasalahan yang dapat diangkat melalui penelitian ini adalah:

1. Apakah antibodi poliklonal anti-inhibin dapat diproduksi dengan penyuntikan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin secara berulang-ulang pada kelinci ?
2. Apakah penyuntikan antibodi poliklonal anti-inhibin dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovulasikan pada tikus putih.
3. Apakah dosis penyuntikan antibodi poliklonal anti-inhibin berpengaruh terhadap jumlah sel telur yang diovulasikan ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah memproduksi antibodi poliklonal anti-inhibin untuk bahan superovulasi.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah :

1. Membuktikan antibodi poliklonal anti-inhibin dapat diproduksi dari kelinci dengan penyuntikan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin secara berulang-ulang.
2. Membuktikan bahwa pemberian antibodi poliklonal anti-inhibin dapat meningkatkan jumlah sel telur tikus putih.
3. Mengetahui dosis terbaik antibodi poliklonal anti-inhibin terhadap peningkatan jumlah sel telur tikus putih

1.4 Hipotesis Penelitian

Adapun hipotesis yang dapat dinyatakan dalam penelitian ini adalah:

1. Antibodi poliklonal anti-inhibin dapat diproduksi dengan cara penyuntikan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin secara berulang-ulang pada kelinci.
2. Penyuntikan antibodi poliklonal anti-inhibin dapat meningkatkan jumlah sel telur pada tikus putih.

3. Antibodi poliklonal anti-inhibin pengenceran 1/10 dengan titer tertinggi adalah dosis terbaik untuk meningkatkan jumlah sel telur.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah:

1. Menghasilkan produk pilihan untuk superovulasi selain menggunakan hormon PMSG.
2. Antibodi poliklonal anti-inhibin yang dihasilkan dapat pula diterapkan untuk meningkatkan produksi sel telur pada ternak lain.
3. Informasi ilmiah yang didapat akan memperkaya ilmu pengetahuan di bidang reproduksi khususnya tentang antibodi poliklonal anti-inhibin dan superovulasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Siklus Birahi

Hewan betina yang telah dewasa kelamin akan menjalani siklus birahi karena pertumbuhan organ reproduksi telah sempurna. Dewasa kelamin adalah suatu keadaan dimana alat kelamin seekor hewan telah berfungsi menghasilkan spermatozoa atau sel telur (Sukra, 1983). Menurut Hardjopranjoto (1988), siklus birahi merupakan gabungan fungsi fisiologis alat kelamin betina dimulai saat hewan betina mencapai dewasa kelamin. Birahi merupakan keadaan dimana hewan betina bersedia menerima pejantan untuk kopulasi (Sukra, 1983).

Siklus birahi pada hewan menunjukkan variasi yang berbeda pada setiap spesies hewan. Pada umumnya setiap perubahan siklus birahi yang terjadi secara normal menunjukkan perubahan-perubahan yang sifatnya teratur. Jarak antara birahi yang satu dengan yang berikutnya disebut satu siklus birahi (Partodihardjo, 1992).

Hewan yang memperlihatkan satu kali periode birahi dalam satu tahun disebut hewan monoestrus seperti harimau dan singa. Hewan yang dalam setahun memperlihatkan periode birahi dua kali disebut diestrus contohnya anjing dan kucing yang telah didomestikasikan. Hewan-hewan yang periode birahinya lebih dari dua kali dalam satu tahun disebut poliestrus seperti sapi, mencit, tikus dan babi (Sukra, 1983).

2.1.1 Faktor Yang Mempengaruhi Siklus Birahi

Timbulnya birahi yang pertama pada sebagian besar mamalia disebabkan oleh perubahan-perubahan dari hipofisa. Pada saat sekresi hormon gonadotropin cukup tinggi dalam darah maka akan mempengaruhi aktivitas ovarium untuk menghasilkan sel telur dan munculnya gejala birahi secara klinis (Guyton, 1983 ; Hardjopranjoto, 1988).

Banyak faktor yang mempengaruhi lama siklus birahi seperti musim dan cahaya matahari, suhu, makanan, pekerjaan, penyakit, gangguan hormonal, genetik dan kebuntingan (Hardjopranjoto, 1988).

2.1.2 Mekanisme Siklus Birahi

Siklus birahi pada mamalia umumnya terbagi menjadi empat periode menurut perubahan-perubahan yang tampak maupun yang tidak tampak dari luar selama siklus birahi yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Siklus birahi diatur oleh mekanisme endokrin dan neuroendokrin yaitu hormon-hormon *Gonadotropin Releasing Hormon* (GnRH) berasal dari hipotalamus, gonadotropin dari kelenjar hipofisa anterior dan hormon steroid yang disekresikan oleh ovarium (Ismudiono, 1996 ; Partodiharjo, 1992).

Mekanisme siklus birahi diatur oleh kelenjar hipofisa anterior. Pelepasan hormon gonadotropin (FSH, LH dan LTH) dari kelenjar tersebut dipengaruhi oleh umpan balik dari kadar hormon progesteron dan estrogen dalam darah. Kadar estrogen yang rendah dalam darah akibat dari folikel yang belum berkembang akan menggertak hipofisa anterior untuk melepaskan FSH. *Folicle Stimulating*

Hormon (FSH) menyebabkan pertumbuhan folikel dan dalam pertumbuhannya folikel tersebut menghasilkan estrogen dan inhibin. Inhibin bekerja dengan jalan menghambat kerja FSH melalui mekanisme umpan balik negatif dari hipofisa anterior, sedang estrogen bekerja sebagai umpan balik positif pada hipotalamus untuk mensekresi LH. Sentakan LH menyebabkan terjadinya ovulasi yang dilanjutkan pembentukan korpus luteum untuk menghasilkan progesteron. Progesteron bekerja sebagai umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior. kadar estrogen mencapai konsentrasi tertinggi pada saat folikel mencapai tahapan folikel de Graaf yang berisi ovum yang telah masak. Estrogen bekerja merangsang hipofisa anterior mengeluarkan LH untuk proses ovulasi (Lunnenfel, 1978). Setelah ovulasi, kadar LH dalam darah akan menurun dengan cepat, tetapi tidak sampai pada kadar basal (Partodiharjo, 1992).

Setelah ovulasi corpus luteum tumbuh dari sisa-sisa folikel yaitu sel-sel granulosa, sel teka interna dari folikel yang mengalami proses luteinisasi dibawah pengaruh hormon LH dan LTH dari hipofisa anterior. Selanjutnya progesteron mulai dihasilkan oleh corpus luteum yang mengakibatkan hambatan terhadap sekresi FSH, sehingga pertumbuhan folikel yang baru dapat dicegah (Hardjopranjoto, 1988).

Adanya corpus luteum menandai fase metestrus, hal ini mengakibatkan kadar hormon progesteron meningkat. Tingginya kadar progesteron akan menghambat pelepasan FSH, sehingga pertumbuhan folikel terhenti untuk sementara waktu. Kadar hormon estrogen di dalam darah sudah sedemikian rendah sehingga rangsangan terhadap hipofisa anterior untuk mengeluarkan LH

juga berhenti. Akibatnya pengaruh LH terhadap corpus luteum akan terhenti. Tidak adanya pengaruh dari LH maka corpus luteum akan mengalami regresi. Regresi corpus luteum bisa diakibatkan oleh adanya faktor luteolitik dari endometrium yakni Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) yang bekerja pada ovarium dan menyebabkan regresi korpus luteum. Kondisi tersebut menandai berlangsungnya fase diestrus dalam siklus birahi hewan betina. Regresi corpus luteum menyebabkan sekresi progesteron terhenti, selanjutnya kadar progesteron di dalam darah menurun dan akan disekresikan FSH. Dengan demikian mulailah hipofisa anterior mengeluarkan FSH kembali yang diperlukan untuk perkembangan folikel-folikel baru. Demikian seterusnya mekanisme tersebut akan terulang kembali didalam siklus birahi hewan betina selama proses reproduksi masih berlangsung (Turner dan Bagnara, 1988).

2.1.3 Siklus Birahi Pada Tikus

Tikus termasuk hewan poliestrus, artinya terjadi lebih dari dua kali estrus dalam satu tahun. Siklus birahi terbagi menjadi empat periode yaitu : proestrus, estrus, metestrus dan diestrus (Baker *et al.*, 1979 ; Toelihere, 1985). Masing-masing periode dapat diketahui dengan pemeriksaan ulas vagina, mengamati tingkah laku hewan tersebut dan perubahan alat kelamin luar (Norris, 1990 ;).

Dibandingkan dengan mamalia yang lain siklus birahi pada tikus berjalan dalam waktu yang relatif pendek yaitu 4-5 hari (Hafez, 1993). Dalam satu siklus birahi didapatkan adanya perubahan-perubahan yang tampak maupun yang tidak

tampak dari luar selama siklus birahi. Menurut Baker *et al.* (1979), Hafez (1993), Turner dan Bagnara (1988) perubahan-perubahan tersebut antara lain :

1. Periode proestrus ditandai dengan perubahan tingkah laku tikus betina yang mulai menerima pejantan walaupun belum melakukan kopulasi. Proestrus disebut juga fase persiapan yang ditandai folikel mulai membesar serta dengan vulva sedikit bengkak serta pH vagina 5,4. Pada sediaan ulas vagina tampak adanya sel-sel epitel berinti berbentuk koma yang panjang. Periode ini biasanya berlangsung kurang lebih 12 jam.
2. Periode estrus adalah periode terpenting dalam siklus birahi. Periode ini ditandai dengan penurunan aktivitas berlari, telinga gemetar, mau menerima pejantan, folikel besar dan mengalami pematangan, vulva membengkak, vagina kering, ditandai dengan terlihatnya sel-sel epitel yang telah mengalami kornifikasi pada preparat ulas vagina. Periode ini berlangsung kurang lebih 12 jam.
3. Periode metestrus, ditandai dengan vulva yang masih membengkak sampai tidak bengkak, adanya masa perkejuan dalam vagina. Pada preparat ulas vagina terlihat adanya leukosit dan masih ada beberapa sel yang mengalami perkejuan. Tingkah laku yang tampak adalah tikus betina tidak mau menerima pejantan. Periode ini berlangsung kurang lebih 12 jam.
4. Periode diestrus merupakan periode terpanjang (60 – 70 jam). Periode ini ditandai dengan vulva tidak membengkak, serta pH vagina 6,1 dan pada preparat ulas vagina terlihat sel-sel epitel dan sel-sel leukosit. Tingkah laku yang tampak adalah tikus betina tidak mau menerima pejantan.

2.2 Pertumbuhan Dan Perkembangan Folikel

Pertumbuhan dan perkembangan folikel dibagi menjadi empat tahap. Tahap pertama terjadi pada waktu hewan betina masih dalam kandungan sampai setelah lahir. Tahap ini terjadi pertumbuhan folikel primer yang berasal dari satu primordial sel yang membelah diri. Pada folikel primer, sel telur (oosit primer) dikelilingi oleh sel-sel kecil yang disebut sel granuloza (Partodihardjo, 1992).

Folikel primer kemudian berkembang menjadi folikel sekunder yang sel-sel telurnya dikelilingi oleh dua lapis sel granuloza. Dibandingkan dengan folikel primer, folikel sekunder mempunyai pembungkus tipis yang disebut membrana vitelin dan pembungkus yang lebih tebal disebut zona pelusida. Folikel sekunder ukurannya lebih besar dan terletak agak jauh dari permukaan ovarium. Pertumbuhan folikel primer menjadi folikel sekunder merupakan pertumbuhan tahap kedua dan terjadi setelah hewan betina lahir serta mengalami proses pendewasaan tubuh (Ismudiono, 1996; Partodihardjo, 1992).

Tahap ketiga terjadi pertumbuhan folikel sekunder menjadi folikel tersier yang mempunyai ukuran lebih besar dan letaknya lebih jauh dari permukaan ovarium. Tahap ini terjadi diwaktu hewan menjadi dewasa dan akan mengalami birahi yang pertama kali. Folikel tersier punya ruang yang disebut antrum folikuli. Antrum ini pada permulaannya hanya satu kemudian bertambah banyak yang berisi cairan folikel. Sel telur pada tahap ini disebut ootid (Partodihardjo, 1992).

Tahap terakhir yaitu tahap keempat, terjadi perubahan pada folikel tersier menjadi folikel de Graaf yang merupakan bentuk terakhir dan terbesar. Pada

tahap ini terjadi hanya beberapa hari menjelang birahi dan sering disebut tahap pemasakan. Pada sapi dengan diameter folikel mencapai 9-20 mm yang banyak mengandung cairan folikel didalamnya, pada tahap inilah cairan folikel diambil dan diidentifikasi adanya hormon inhibin (Beard *et al.*, 1991).

Folikel de Graaf dilapisi oleh dua lapisan stroma, yaitu teka interna dan teka eksterna, sel terbungkus oleh massa sel yang disebut kumulus oophorus (discus poligerus). Sel telur dengan sel yang membungkusnya menonjol kedalam ruang antrum yang penuh dengan cairan folikel (Hardjopranjoto, 1988; Partodihardjo, 1992).

2.3 Ovulasi

Ovulasi adalah pelepasan ovum dari folikel de Graaf pada ovarium. Jumlah ovum yang diovulasikan oleh kedua ovarium (*ovulation rate*) pada satu siklus birahi adalah berbeda-beda menurut jenis hewan, umur dan hereditasnya (Toelihere, 1985). Waktu ovulasi sebagian besar mamalia adalah pada periode akhir birahi (Hafez, 1993 ; Salisbury dan Vandemark, 1985).

Pada golongan mamalia terdapat dua macam ovulasi yaitu ovulasi spontan (*spontaneous ovulation*) dan ovulasi tertertak (*induced ovulation*). Ovulasi spontan adalah ovulasi yang terjadi tanpa adanya rangsangan apapun dan prosesnya akan diulangi secara teratur pada setiap satu siklus birahi. Sedangkan ovulasi tertertak adalah ovulasi yang terjadi karena adanya rangsangan pada servik sewaktu proses koitus (Breazile, 1971 ; Hardjopranjoto, 1988 ; Nalbandov, 1990).

Tikus merupakan hewan mamalia yang mempunyai ovulasi spontan, dimana ovulasi terjadi disebabkan oleh stimulasi hormon LH. Penyuntikan LH dapat menyebabkan perkembangan folikel, tetapi tidak segera diikuti oleh ovulasi, karena LH memerlukan waktu untuk menjalankan peranannya dalam proses ovulasi. Misalnya, pada kelinci, ovulasi terjadi 10 jam sesudah kopulasi (pelepasan LH) atau sesudah penyuntikan LH (Toelihere, 1985). Akibat stimulasi dari hormon LH, jumlah aliran darah yang menuju ke ovarium menjadi meningkat. Peningkatan ini menurut Toelihere (1985), membawa pengaruh terhadap terlepasnya enzim proteolitik seperti kolagenolase ke dalam cairan folikuler. Enzim ini menyebabkan melemahnya dinding folikel pada daerah avaskuler pada folikel de Graaf yang disebut stigma. Terjadinya robekan pada daerah stigma tersebut diikuti dengan keluarnya cairan folikel. Dalam waktu yang singkat, sel telur bergerak menuju ke bagian yang sobek dan masuk ke dalam infundibulum dari tuba falopii dengan bantuan rambut getar.

2.4 Struktur Kimia Dan Mekanisme Kerja Inhibin

Inhibin adalah hormon yang diproduksi oleh sel sertoli dalam tubulus seminiferus dari testis hewan jantan dan sel granulosa dari folikel de Graaf ovarium hewan betina yang disebut juga dengan *folliculostatin*. Sekresi inhibin oleh kedua jenis hewan ini dapat menghambat pelepasan FSH dari hipofisa anterior tanpa mempengaruhi pelepasan LH (Braid *et al.*, 1991; Ismudiono, 1996).

Ditinjau dari struktur kimianya inhibin adalah termasuk hormon glikoprotein dengan berat molekul 32 kDa. dan mempunyai 2 ikatan peptida yang disebut sebagai subunit α dan subunit β (Ward and Steinberger, 1988).

Sintesis inhibin dalam sel sertoli pada testes dan sel granulosa dari folikel diatur oleh hormon-hormon dari hipotalamus dan hipofisa anterior. *Gonadotropine releasing hormone* (GnRH) dari hipotalamus bekerja pada sel basopil dari hipofisa anterior untuk mensekresikan gonadotropin. GnRH berikatan dengan reseptor yang ada dipermukaan sel membran dari sel basopil hipofisa anterior. Ikatan tersebut akan mengaktifkan enzim adenilat siklase, suatu enzim yang diperlukan untuk katalisa *Adenosine Triphosphate* (ATP) menjadi *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP). Selanjutnya cAMP mengaktifkan proteinkinase dan mempengaruhi proses fosforilasi protein di dalam inti sel sehingga terjadi transkripsi DNA dan menghasilkan mRNA dan tRNA. *Massenger RNA* keluar dari inti menuju ribosom pada retikulum endoplasmik, selanjutnya berjajar dipermukaan ribosom membentuk polisom. Transkripsi RNA yang membawa asam amino bergerak menuju ribosom, asam-asam amino yang dibawah tRNA akan diterjemahkan oleh mRNA melalui proses translasi dan transkripsi untuk dibentuk protein khusus sesuai dengan kodon-kodon dari mRNA. Protein yang terbentuk (FSH dan LH) bergerak menuju golgi aparatus untuk dipadatkan membentuk granula sekretoris. Granula sekretoris bergerak ke tepi menuju dinding sel membran untuk dikeluarkan isinya menuju peredaran darah (Austin and Short, 1984).

Inhibin yang dihasilkan oleh sel sertoli melalui mekanisme umpan balik negatif akan menghambat sekresi FSH dari hipofisa anterior. Sedangkan testosteron yang dihasilkan oleh sel leydig dibawah pengaruh LH mempunyai mekanisme umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior sehingga menghambat sekresi gonadotropin oleh hipofisa anterior (Tomaszewska dkk, 1991)

Inhibin yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa dari folikel ovarium akan menghambat sekresi FSH melalui mekanisme umpan balik negatif terhadap hipofisa anterior sedangkan estradiol dapat bekerja sebagai umpan balik positif pada hipotalamus. Gertakan LH menyebabkan terjadinya ovulasi dan terbentuk corpus luteum. Corpus luteum menghasilkan progesteron yang bekerja sebagai umpan balik negatif terhadap hipotalamus dan hipofisa anterior sehingga FSH dan LH tidak di produksi oleh hipofisa anterior dan berakibat pertumbuhan folikel dan proses ovulasi tidak terjadi sampai pada saat corpus luteum mengalami regresi (Tomaszewska dkk, 1991).

2.5 Respon Imun

Respon imun diperlukan untuk tiga hal yaitu, pertahanan, homeostatis dan pengawasan. Respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan diluar dan didalam badan. Tidak semua suntikan antigen menimbulkan respon imun. Respon imun tergantung dosis, waktu pemberian dan sifat antigen (Widjaja, 1988).

Respon imun dibedakan menjadi dua macam yaitu respon imun spesifik dan respon imun nonspesifik. Respon imun spesifik merupakan suatu reaksi hospes terhadap benda asing yaitu mencakup rangkaian interaksi seluler yang diekspresikan dengan penyebaran produk-produk sel spesifik. Respon imun spesifik dibedakan dengan respon nonspesifik dalam hal spesifitas, heterogenik, dan memori. Spesifitas merupakan kemampuan respon imun dengan kepekaan yang tinggi. Produk-produk respon imun akan bereaksi seluruhnya dengan yang identik atau yang sama dengan benda yang terdahulu yang memulai respon (Bellanti, 1993).

Sistem imun nonspesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai macam organisme oleh karena dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Sistem tersebut disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir yang berupa permukaan tubuh dan berbagai komponen dalam tubuh. Komponen sistem imun nonspesifik dapat dibagi sebagai pertahanan fisik dan mekanik, pertahanan biokimia, pertahanan humoral dan pertahanan seluler (Widjaja, 1988).

2.6 Antigen Dan Imunogen

Antigen merupakan suatu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun. Sedangkan imunogen adalah suatu bahan atau molekul yang dapat menimbulkan respon imun, humoral atau seluler. Pada umumnya imunogen adalah antigen meskipun tidak selalu demikian

(Widjaja, 1988). Suatu bahan atau molekul dapat bersifat imunogen, tergantung pada beberapa faktor, yaitu: Komposisi kimiawi, ukuran molekul, kompleks kimiawi, susunan genetik dari hewan itu sendiri, keasingan dan metode pelaksanaannya (Goodman, 1994).

2.7 Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin

Produksi serum hiperimun adalah imunisasi dengan sengaja terhadap hewan dengan suatu imunogen yang spesifik dalam rangka untuk mendapatkan suplai antibodi terhadap imunogen (Smith, 1995). Antibodi yang dikoleksi dari hasil *hiperimunisasi* dikenal sebagai antibodi poliklonal.

Makromolekul dengan berat molekul lebih besar dari 5000 dalton misalnya polipeptida besar dan protein dapat merangsang respon imun yang kuat terutama jika dicampur dan berikatan dengan adjuvan (Smith, 1995). Sedangkan preparat hormon dengan berat molekul yang besar mempunyai sifat imunogenik sehingga dapat dimanfaatkan sebagai antigen untuk dapat menginduksi timbulnya antibodi spesifik terhadap antigen tersebut. Inhibin mempunyai berat molekul 32 kDa dan termasuk glikoprotein sehingga merupakan hormon yang potensial dalam menstimulir pembentukan antibodi yaitu antibodi inhibin (Glencross *et al.*, 1994).

Pemilihan spesies hewan coba untuk memproduksi antibodi poliklonal anti inhibin didasarkan pada banyaknya volume serum yang dibutuhkan, hewan jenis apa saja yang tersedia dan pertimbangan dari pengalaman peneliti. Biasanya para peneliti lebih menyukai hewan coba kelinci oleh karena hewan ini murah,

gampang dipelihara, daya tahannya tinggi dan mudah diambil darahnya (Smith, 1990).

Menurut Harlow and Lane (1988) pemilihan *adjuvant* dapat mempengaruhi cara penyuntikan, bila menggunakan *adjuvant* yang daya serapnya lambat terutama *adjuvant oil* seperti *Freund*, harus diusahakan agar penderitaan hewan dibuat sekecil mungkin. Dosis imunogen yang dianjurkan untuk kelinci adalah 50-1000 μg .

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kemajiran Fakultas Kedokteran Hewan. Pemeriksaan cairan folikel bebas steroid yang mengandung inhibin dilaksanakan di Laboratorium *Dengue Haemorrhagic Fever, Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga. Produksi antibodi dilaksanakan di Induk Kandang Hewan Percobaan (IKHP) Pusat Veterinery Farma (PUSVETMA). Uji ELISA dilakukan di Laboratorium Virologi dan Immunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Uji efektifitas pada tikus sekaligus penghitungan jumlah oosit dilakukan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Waktu penelitian dilaksanakan mulai tanggal 20 Maret 2000 dan berakhir tanggal 12 Februari 2001.

3.2. Materi Penelitian

a. Hewan Percobaan

Kelinci jantan yang sudah dikastrasi berumur enam bulan sebanyak tujuh ekor dengan berat rata-rata 700 gram berasal dari Pusat Veterinery Farma (PUSVETMA). Tikus putih betina galur wistar, sebanyak empat puluh ekor, umur dua setengah sampai tiga bulan dengan berat rata-rata 200 – 250 gram, tikus jantan delapan ekor, umur lima bulan dengan berat rata-rata 300 – 400 gram sebagai pejantan pemacek.

b. Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang digunakan meliputi: ovarium sapi, larutan NaCl fisiologis, *charcoal*, eter, alkohol 70%, *aquadest*, *phospat buffer saline* (PBS), *freund's adjuvan-complete*/adjuvan lengkap, *freund's adjuvant-incomplete*/adjuvan tidak lengkap, konjugat (goat-anti rabbit Ig G labeled alkaline phosphatase), substrat 4-NPP (para nitrofenil fosfat).

c. Alat-alat

Perlengkapan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

Mikroskop Differential Interferon Contrast (DIC), mikroskop inverted stereo, alat untuk uji ELISA (ELISA *reader*, micro plate, pipet mikro, erlenmayer), seperangkat alat SDS-PAGE, timbangan analitik, refrigerator, *Syringe* (10 ml, 2,5 ml, tuberculin), tabung venojec 10 ml, gelas obyek, gelas penutup, gelas beker, aluminium *foil*, ultrafilter 1 μm dan 0,2 μm , sentrifus, *mixer mini*, *eppendroff*, termos es, kantong plastik, cawan petri disposable (nuclon), pipet mulut modifikasi, alat bedah mikro (gunting, scalpel, pinset), bunzen, kapas,



Gambar 1. Alat-alat untuk *flushing* sel telur tikus.

d. Kandang Penelitian

Kandang kelinci berupa kandang postal yang terbuat dari tembok dengan ukuran 2 x 2 m, dilengkapi dengan tempat makan dan minum. Untuk kandang tikus terdiri atas dua macam kandang, yang pertama dari bak plastik dengan ukuran panjang, lebar, dan tinggi masing-masing 50 x 30 x 20 cm yang ditutup dengan ram kawat disertai tempat makan dan minum. Kandang yang kedua adalah kandang individual untuk proses perkawinan yang terbuat dari bak plastik dengan ukuran panjang, lebar, dan tinggi masing-masing 35 x 25 x 15 cm yang ditutup dengan ram kawat.

e. Makanan

Makanan kelinci berupa sayuran yang diperoleh dari Pasar Keputran Surabaya, dan untuk tikus berupa konsentrat ayam broiler (CP 511), dan air minum yang diberikan secara ad libitum.

3.3. Metode Penelitian

Prosedur penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap

Tahap I: Ekstraksi Cairan Folikel Sapi

Ovarium sapi dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian dengan syarat ovarium tersebut terdapat folikel dominan (de Graaf) dengan diameter ≥ 9 mm dipermukaan ovarium. Ovarium dibilas dan dibersihkan dengan NaCl fisiologis, kemudian dimasukkan dalam termos es yang berisi NaCl fisiologis, selanjutnya dibawa ke Laboratorium Kemajiran untuk diaspirasi cairan folikelnya.

Cairan folikel yang didapat di sentrifus dengan kecepatan 2000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C untuk menghilangkan runtuh sel. Selanjutnya cairan folikel ditambahkan *charcoal* dengan dosis 30 mg/ml, kemudian dilakukan pengadukan dengan *mixer mini* dengan suhu 4 °C, selama 12 jam. Selanjutnya untuk mendapatkan cairan folikel sapi bebas steroid (< 0,3 % residu steroid), larutan tersebut di sentrifus dengan kecepatan 30.000 rpm selama satu jam pada suhu 4 °C dilanjutkan dengan filtrasi bertahap dengan menggunakan mikrofilter ukuran membran 1 µm dan 0,2 µm (Knight *et al.*, 1990).

Untuk mengetahui bahwa cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin (CFSBSI) tersebut mempunyai berat molekul 32 kDa maka dideteksi dengan *Sodium Diodesil Sulphate Poli Akrilamid Gel Elektroforesis* (SDS-PAGE) di *Laboratorium Dengue Haemorrhagic Fever, Tropical Disease Centre* dan dilanjutkan dengan spektrofotometer untuk mengetahui kandungan essensial protein yang terkandung di dalam CFSBSI tersebut. (prosedur SDS-PAGE dapat dilihat pada lampiran 1).

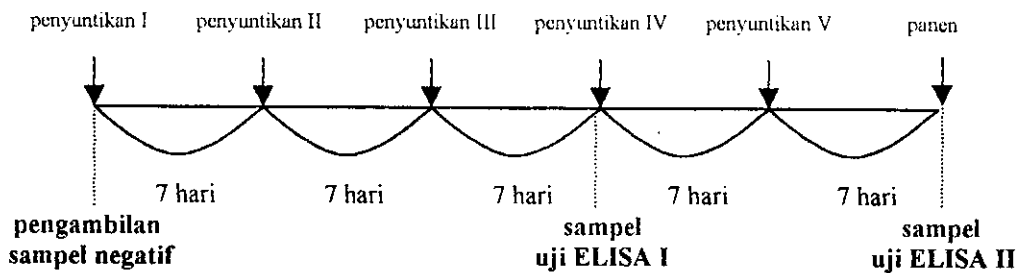
Tahap II: Produksi Antibodi Poliklonal Anti-inhibin

Pada tahap ini digunakan kelinci sebanyak tujuh ekor dengan perlakuan sebagai berikut:

1. CFSBSI 500 µg + *Freund's Complete Adjuvant* = 0,5 ml
2. CFSBSI 500 µg + *Freund's Incomplete Adjuvant* = 0,5 ml
3. CFSBSI 500 µg + *Freund's Incomplete Adjuvant* = 0,5 ml
4. CFSBSI 500 µg + *Freund's Incomplete Adjuvant* = 0,5 ml
5. CFSBSI 500 µg + *Freund's Incomplete Adjuvant* = 0,5 ml

Prosedur Perlakuan

- Kelinci diadaptasikan dengan lingkungan percobaan selama dua minggu.
- Pada minggu pertama sebelum penyuntikan, masing-masing kelinci diambil darahnya sebanyak 1 ml dari vena Auricularis sebagai sampel kontrol negatif.
- Penyuntikan dilakukan secara sub cutan dengan selang waktu penyuntikan tujuh hari.
- Pada hari ke-21 sebelum penyuntikan keempat, kelinci diambil darahnya sebanyak 1 ml dari vena Auricularis guna dilakukan uji ELISA.
- Pada hari ke-35, dilakukan pemanenan serum antibodi poliklonal anti-inhibin (Ab. Po. Anti-inhibin). Darah diambil dari jantung (intra cardial) sampai habis dan dilakukan uji ELISA. (prosedur ELISA terlampir).



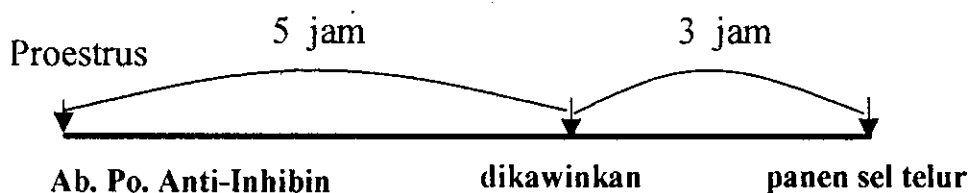
Gambar 2. Jadwal penyuntikan produksi Ab. Po. Anti inhibin pada kelinci.



Gambar 3. Pengambilan darah kelinci secara intra cardial.

Tahap III : Uji Efektivitas pada Tikus

Tikus yang digunakan sebanyak 40 ekor tikus betina umur 2,5 – 3 bulan dan 8 ekor tikus jantan yang sudah dikastrasi. Penyuntikan Antibodi poliklonal anti-inhibin pada tikus betina dilakukan secara intra peritoneal pada fase proestrus. Prosedur jadwal penyuntikan dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Jadwal pelaksanaan panen sel telur.

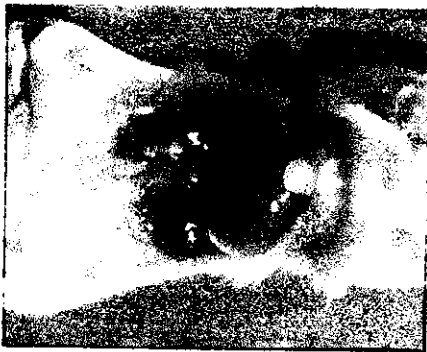
Sebelum penyuntikan antibodi Poliklonal anti-inhibin, dilakukan pemeriksaan ulas vagina untuk menentukan fase birahi dari tikus tersebut.

Secara keseluruhan dosis yang digunakan masing-masing perlakuan adalah sebagai berikut;

- a. Kontrol (P_0); NaCl fisiologis 0,2 ml.
- b. Perlakuan I (P_1); Ab Po anti-inhibin 0,2 ml (pengenceran 1/10)
- c. Perlakuan I (P_2); Ab Po anti-inhibin 0,2 ml (pengenceran 1/20)
- d. Perlakuan I (P_3); Ab Po anti-inhibin 0,2 ml (pengenceran 1/40)
- e. Perlakuan I (P_4); Ab Po anti-inhibin 0,2 ml (pengenceran 1/80)

Delapan jam setelah penyuntikan dilakukan panen sel telur, dengan cara memisahkan dan mengangkat tuba fallopii dari uterus dan dilakukan pencucian tuba fallopii dengan PBS. Setelah bersih, tuba fallopii ditempatkan pada cawan petri untuk dilakukan panen sel telur dengan cara merobek kantong fertilisasi di

bawah mikroskop DIC dengan menggunakan kanula (syringe tuberculin). Oosit yang telah dipanen dipindahkan pada cawan petri lain yang sudah ditetesi PBS agar memudahkan dalam proses penghitungan.



Gambar 5. uterus dan tuba fallopii tikus



Gambar 6. kantong fertilisasi.

3.4. Parameter Pengamatan

Pada penelitian ini peubah yang diamati adalah titer antibodi yang dihasilkan setelah pembacaan uji ELISA dengan ELISA reader dan jumlah sel telur yang dihasilkan pada masing-masing pengenceran.

3.5. Rancangan Penelitian dan Analisis Data

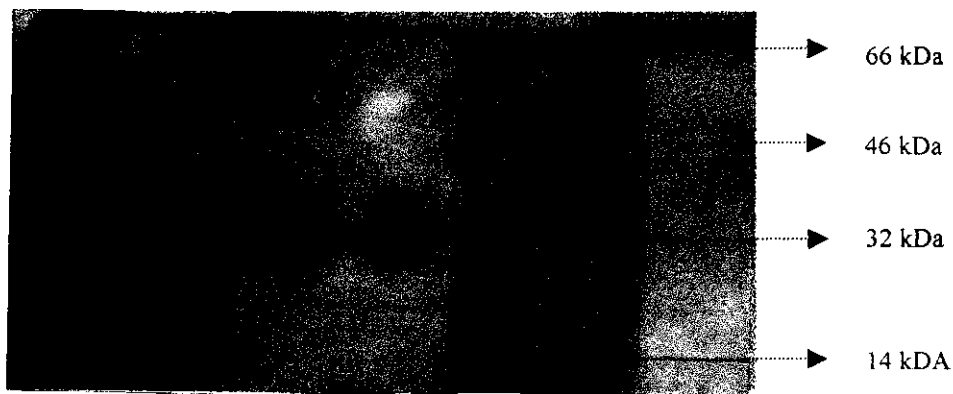
Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan lima perlakuan dan delapan ulangan. Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji F. Jika terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) 1 % (Kusriningrum, 1989).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

4. 1. Produksi Antibodi Poliklonal Anti Inhibin

Hasil pengujian cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin dengan menggunakan SDS-PAGE diketahui berat molekul inhibin adalah 32.kDa. Kemudian dilanjutkan dengan peneraan kadar protein menggunakan spektrofotometer. Kadar protein yang diperoleh adalah 9.637 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 7. Inhibin dengan Berat Molekul 32 kDa. pada sapi.

Pembacaan hasil titer antibodi poliklonal anti-inhibin menggunakan ELISA Reader dengan panjang gelombang 405 nm pada masa inkubasi selama 15 menit. Titer antibodi ditunjukkan dengan nilai absorban kerapatan optik (*optical density*, OD) pada pengenceran tertinggi yang besarnya 2 x dari *Cut Of Value* (COV). Nilai *Cut Of Value* (COV) adalah nilai rata-rata dari sampel kontrol negatif. Adapun hasil pemeriksaan titer antibodi poliklonal anti-inhibin yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 dibawah ini.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Uji ELISA pada Pembacaan 15 Menit setelah Tiga Kali Penyuntikan

KELINCI	K	PENGECERAN										
		1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960
I	0,121	1,517	1,410	1,070	1,032	0,979	0,783	0,663	0,511	0,317	0,196	0,143
II	0,132	2,336	2,309	1,617	1,616	1,437	1,281	1,049	0,639	0,528	0,371	0,227
III	0,172	2,783	2,500	2,367	2,013	1,560	1,558	1,539	1,069	0,650	0,446	0,312
IV	0,147	2,343	2,118	1,750	1,367	1,275	1,145	0,925	0,734	0,508	0,290	0,205
V	0,125	2,290	2,079	1,891	1,508	0,853	0,680	0,461	0,366	0,276	0,248	0,046**
VI	0,145	2,672	2,346	1,824	1,445	1,071	0,648	0,530	0,410	0,241	0,229	0,038**
VII	0,150	2,432	2,189	1,841	1,020	0,783	0,523	0,471	0,373	0,235	0,230	0,157
VIII	0,143	OUT	2,744	2,203	1,426	0,908	0,606	0,476	0,304	0,260	0,192	0,156

Tabel 2. Hasil Pemeriksaan Uji ELISA pada Pembacaan 15 Menit setelah Lima Kali Penyuntikan

KELINCI	K	PENGECERAN										
		1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	1/20480	1/40960	1/81920
I	0,070	2,797	2,625	2,519	2,324	2,121	1,516	0,967	0,535	0,378	0,193	0,103
II	0,072	OUT	OUT	OUT	2,420	2,031	1,525	1,077	0,573	0,337	0,209	0,122
III	0,073	OUT	OUT	2,731	2,445	2,242	1,759	1,167	0,441	0,383	0,270	0,144
IV	0,069	OUT	2,911	2,663	2,310	1,715	1,419	1,110	0,700	0,414	0,244	0,135
V	0,084	OUT	2,585	2,554	2,171	1,537	1,147	0,822	0,506	0,309	0,143	0,130
VI	0,076	OUT	2,748	2,402	2,118	1,543	1,223	0,836	0,548	0,325	0,167	0,137
VII	0,092	OUT	OUT	2,774	2,397	1,879	1,269	0,836	0,493	0,297	0,144	0,066
VIII	0,075	OUT	OUT	2,931	2,596	1,618	1,375	0,895	0,518	0,354	0,038	0,027

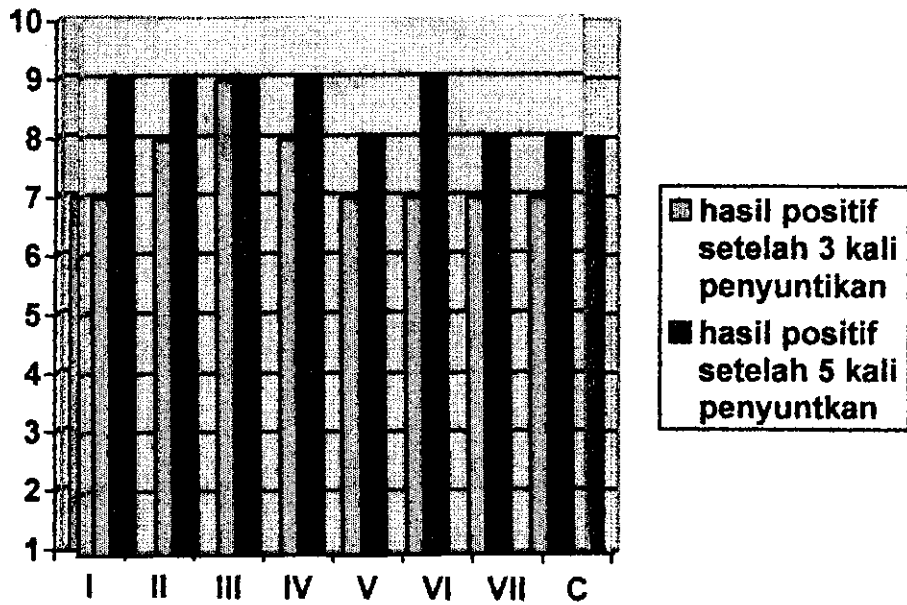
KETERANGAN : - ** adalah kontrol PBS

- K adalah serum kelinci kontrol negatif (sebelum perlakuan)

- I-VII adalah serum kelinci satu sampai tujuh

- VIII adalah serum campuran kelinci satu sampai tujuh

- Out adalah nilai yang melebihi kemampuan nilai baca ELISA Reader.



Keterangan : 1-10 : titer antibodi, 7 : titer 10.240
 8 : titer 20.480, 9 : titer 40.960 ;
 I-VII : serum kelinci 1 sampai 7, C : serum campuran kelinci 1 sampai 7.

Gambar 8. Diagram Batang Titer Ab. Po. Anti-Inhibin yang masih Menunjukkan Nilai Positif pada Tabel 1 dan 2.

4. 2. Uji Efektifitas

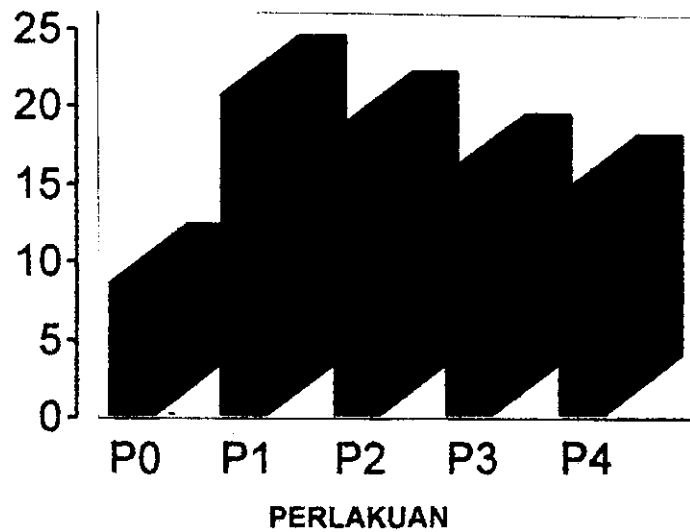
Nilai rata-rata uji efektifitas antara perlakuan dengan kontrol setelah dilakukan uji statistik menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,01$). Rata-rata jumlah sel telur yang dihasilkan setelah dilakukan penghitungan adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Rata-rata Jumlah Sel Telur Tikus Putih setelah Disuntik Ab. Po. Anti-Inhibin

Dosis Ab Po Anti Inhibin	Jumlah Ulangan	Rata-rata Jumlah Oosit + SD
P1	8	20,50 + 3,16 ^a
P2	8	18,12 + 0,99 ^{ab}
P3	8	15,37 + 1,06 ^c
P4	8	14,00 + 1,51 ^c
P0	8	8,37 + 0,92 ^d

Keterangan ; P1 : pengenceran 1/10, P2 : pengenceran 1/20, P3 : pengenceran 1/40, P4 : pengenceran 1/80, P0 : NaCl fisiologis, superskrip yang berbeda Pada baris menunjukkan adanya perbedaan yang nyata ($p < 0,01$).

Rata-rata Jumlah Sel Telur



Gambar 9. Diagram Batang Rata-rata Jumlah Sel Telur Tikus yang Dipanen antara Kelompok Kontrol dan Kelompok Perlakuan Ab. Po. Anti-Inhibin.



Gambar 10. Sel Telur Tikus yang Dibungkus oleh Sel Kumulus yang masih Kompak.

BAB V

PEMBAHASAN

5.1. Produksi Antibodi Poliklonal Anti Inhibin

Prinsip dari sistem imun adalah berfungsi sebagai pelindung bagian tubuh hewan terhadap masuknya organisme, berupa produk beracun atau benda asing, yang bekerja melalui reseptor dengan spesifitas yang rendah sampai tinggi. Produksi antibodi memasukkan antigen pada tubuh secara berulang-ulang disebut produksi serum hiperimun atau poliklonal antibodi (Smith, 1995). Antigen yang digunakan untuk menginduksi respon dapatan antibodi disebut dengan imunogen (Harlow and Lane, 1988).

Pada penelitian ini sebagai benda asing (antigen) yang dimasukkan dalam tubuh hewan adalah inhibin yang diperoleh dari cairan folikel sapi bebas steroid. Produk antibodi yang dihasilkan disebut antibodi poliklonal anti-inhibin. Inhibin termasuk hormon glikoprotein dengan berat molekul 32 kDa, sehingga merupakan antigen yang potensial dalam menstimulasi pembentukan antibodi. Kelinci yang diimunisasi dengan antigen inhibin 500 µg secara berulang-ulang diharapkan dalam sirkulasi darahnya diperoleh antibodi poliklonal anti-inhibin, merupakan imunoglobulin yang terbentuk sebagai akibat reaksi tanggap kebal terhadap antigen yang dikenal pada tubuh kelinci tersebut.

ELISA (*Enzym-Linked Immunosorben Assay*) adalah salah satu metode yang sensitif untuk mendeteksi antibodi, antigen, hormon maupun bahan toksik. Metode ini merupakan pengembangan dari sistem deteksi dengan

immunoflouresence atau radioaktif (Rantam, 2000). Dalam menentukan keberadaan antibodi yang diharapkan diperlukan teknik seleksi yang cepat, sederhana dan hasilnya tidak meragukan. Pembacaan ELISA dapat dilakukan, baik secara kualitatif (dengan mata telanjang/visual) atau secara kuantitatif (dengan spektrofotometer). Secara kualitatif ELISA dibaca dengan melihat perubahan warna antara kelompok yang diperiksa dibandingkan dengan kelompok kontrol (positif dan negatif). Namun demikian adakalanya untuk pembacaan titer (semi-kuantitatif) amat sulit untuk membedakan antara batas pengenceran yang masih positif dengan kontrol negatif. Oleh karena itu secara semi-kuantitatif, selayaknya ELISA dibaca dengan fotometer (*ELISA Reader*) dengan berdasarkan pada nilai absorban kerapatan optik (*optical density, OD*) (Suwarno, 2000).

Pembacaan ELISA dalam penelitian ini menggunakan metode positif atau negatif. Semua sampel yang memberikan nilai absorban diatas nilai rata-rata kontrol negatif (*cut of value, COV*), misalnya 0,2 atau 0,4 dianggap positif. Untuk sampel kecil (<10) COV dipatok pada 2-3 kali rata-rata kontrol negatif; sedangkan untuk sampel 10-100, COV dipatok pada rata-rata kontrol negatif plus 2-3 SD.

Pada penelitian ini dilakukan uji ELISA sebanyak dua kali. Uji ELISA yang pertama dilakukan setelah tiga kali penyuntikan sedang uji ELISA yang kedua setelah lima kali penyuntikan. Hasil penelitian pada uji ELISA yang pertama menunjukkan nilai COV (rata-rata kontrol negatif) sebesar $0,142 \pm 0,016$. Sampel dianggap positif jika nilainya dua kali lebih besar dari nilai COV.

Dari data hasil uji ELISA yang pertama (Tabel 1) menunjukkan bahwa pada kelinci ke-1 sampai pada titer 10.240 masih menunjukkan gejala positif, begitu juga pada kelinci ke-5, 6, 7 dan serum campuran. Sedang pada kelinci ke-2 dan ke-4 pada titer 20.480 masih menunjukkan gejala positif. Pada kelinci ke-3 titer yang didapat merupakan titer yang tertinggi karena sampai pada titer 40.960 masih menunjukkan gejala positif.

Adanya titer yang berbeda ini disebabkan karena respon tiap individu dalam menanggapi antigen yang masuk berbeda-beda. Nilai titer yang rendah setelah dilakukannya uji ELISA disebabkan karena respon imun yang jelek pada hewan. Namun demikian faktor yang mengoptimalkan respon dipandang dari sudut kualitas antibodi yang diproduksi dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya: sifat alam imunogen, *adjuvant*, hewan yang dipilih, rute injeksi dan dosis (Smith, 1995).

Hasil uji ELISA yang kedua (Tabel 2) setelah lima kali penyuntikan menunjukkan nilai COV sebesar $0,076 \pm 0,078$. Pada tabel 2 tersebut menunjukkan bahwa sampai titer 40.960 pada serum kelinci ke-1, 2, 3, 4 dan 6 masih menunjukkan gejala positif, sedangkan pada serum kelinci ke-5, 7 dan serum campuran sampai titer 20.480 masih menunjukkan gejala positif. Berdasarkan data hasil ELISA kedua tersebut dapat dilihat bahwa telah terjadi peningkatan titer antibodi pada tiap-tiap kelinci yang telah divaksin dengan inhibin secara sub cutan, sehingga titer antibodi yang didapat bisa lebih maksimal.

Pemberian *adjuvant* dimaksudkan untuk memperkuat respon timbulnya antibodi, karena antigen yang masuk kedalam tubuh akan direasorpsi secara perlahan, tetes demi tetes sehingga mempunyai jangka waktu yang lama dalam tubuh (Tizard, 1987). Menurut Bellanti (1993), *adjuvant* akan memperbesar respon imun bila disuntikkan bersama-sama dengan imunogen. Fungsinya dianggap menambah area permukaan atau memperlama penyimpanan antigen dalam tubuh, memberi kesempatan pada sistem limfoid untuk menuju ke antigen (*adjuvant Freund*).

Secara umum *adjuvant* yang digunakan dalam produksi serum hiperimun atau antibodi poliklonal adalah *adjuvant Freund*, baik *Freund Complete* (lengkap) maupun *Incomplete* (tidak lengkap). *Adjuvant Complit* digunakan sebagai induksi pertama sedang untuk injeksi booster digunakan *adjuvant Incomplete* (Smith, 1995).

5.2. Uji Efektifitas

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektifitas dari antibodi poliklonal anti-inhibin dalam menetralkan daya kerja inhibin sehingga diharapkan terjadi sekresi FSH dari hipofisa anterior. Superovulasi adalah proses biologi pertumbuhan, pematangan dan pelepasan sel telur dari folikel dalam jumlah melebihi ovulasi alamiah.

Penyuntikan antibodi poliklonal anti inhibin secara intra peritoneal pada tikus betina, berpengaruh nyata terhadap jumlah sel telur yang diovulasikan. Hal ini bisa dilihat dari perbandingan antara tikus kontrol dengan tikus perlakuan.

Dari hasil penelitian ini terdapat kecenderungan bahwa semakin tinggi dosis antibodi poliklonal anti inhibin akan diikuti semakin tingginya jumlah sel telur yang diovulasikan.

Jumlah sel telur yang diovulasikan dalam satu siklus birahi secara normal adalah 8-12 dengan jumlah anak rata-rata 9 (Hafez, 1993). Pada perlakuan kontrol yang mendapat suntikan 0,2 ml NaCl Fisiologis ditemukan jumlah sel telur dengan rata-rata $8,375 \pm 0,916$. Hal ini berbeda dengan perlakuan P4 dan P3 yang mendapat suntikan 0,2 ml Ab. Po. Anti inhibin dengan dosis pengenceran 1/80 dan 1/40, jumlah sel telur yang diovulasikan semakin meningkat yaitu rata-rata $14,000 \pm 1,512$ dan $15,375 \pm 1,061$.

Pada perlakuan P2 dan P1 yang mendapat suntikan 0,2 ml Ab. Po. Anti inhibin dengan dosis pengenceran 1/20 dan 1/10 terlihat semakin jelas peningkatan sel telur yang diovulasikan dengan rata-rata $18,125 \pm 0,991$ dan $20,500 \pm 3,162$. Hal ini membuktikan bahwa pada pengenceran tersebut antibodi poliklonal anti inhibin mampu menghambat kerja inhibin sehingga terjadi peningkatan sekresi FSH yang mengakibatkan meningkatnya jumlah sel telur yang diovulasikan melebihi rata-rata kondisi normal.

Hormon-hormon polipeptida yang dihasilkan oleh hipofisa anterior dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu kelompok kortikotropin, glikoprotein dan somatomotropin (Djojosoebagio, 1996). Dalam kaitannya diatas inhibin merupakan salah satu kelompok dalam golongan glikoprotein yang mempunyai daya kerja menghambat sintesis dan sekresi gonadotropin dari kelenjar pituitari, terutama pengeluaran FSH (Findlay *et al.*, 1990). Hal ini diperkuat oleh

pendapat Knight (1990) dan Robertson *et al* (1990) bahwa inhibin dengan berat molekul antara 30-32 kDa mempunyai daya kerja sebagai penekan pengeluaran FSH.

Sedangkan menurut Hafez (1993) FSH berperan dalam proses folikulogenesis yakni meningkatkan jumlah folikel pada stadium pertumbuhan, selanjutnya folikel akan berkembang menjadi folikel primer kemudian menjadi folikel sekunder selanjutnya menjadi folikel tersier yang ditandai adanya perkembangan sel granulosa sehingga folikel tampak lebih besar dan akhirnya menjadi folikel de Graaf. Pada saat ini sel granulosa mensintesa inhibin. Inhibin yang dihasilkan oleh sel-sel granulosa ini akan menghambat pengeluaran FSH melalui mekanisme umpan balik terhadap hipofisa anterior, sehingga dengan pemberian antibodi poliklonal anti inhibin akan menghambat aktifitas kerja inhibin dari sel granulosa dengan demikian FSH akan tetap disekresi dan folikel lain akan tetap tumbuh. Hal ini terbukti dari hasil penelitian, jumlah sel telur yang dihasilkan oleh tikus betina yang disuntik antibodi poliklonal anti-inhibin jumlahnya lebih banyak dibandingkan jumlah sel telur yang dihasilkan oleh tikus betina yang tidak diberi perlakuan (Campbell *et al.*, 1991).

Secara nyata ada dua bentuk inhibin tipe α dan β , dimana pada bagian sub unit α secara umum sama, tetapi berbeda pada sub unit β . Diperkirakan pada sub unit α sendiri dapat membentuk antibodi sebagai dasar vaksin untuk menetralkan semua tipe inhibin (Findlay *et al*, 1993).

Menurut O'shea *et al* (1982) menyatakan bahwa imunisasi pada domba dengan menggunakan preparat kasar dari *bovine follicle fluid* (BFF) atau cairan

folikel sapi dapat meningkatkan jumlah ovulasi dan jumlah anak per kelahiran. Peningkatan kemurnian BFF imunogen (dengan cara *Immuno Affinity Chromatography*), bisa meningkatkan respon dan menyebabkan adanya korelasi yang bagus antara peningkatan titer antibodi dengan peningkatan jumlah ovulasi (O'shea *et al*, 1989).

Pada tabel 3 dapat dilihat bahwa semakin besar dosis antibodi poliklonal anti inhibin yang digunakan dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovulasikan. Hal ini membuktikan antibodi poliklonal anti inhibin mampu menghambat atau menetralkan kerja inhibin dalam menghambat sekresi FSH sehingga mengakibatkan terjadinya sekresi FSH ditandai jumlah sel telur yang diovulasikan melebihi jumlah normal.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Antibodi poliklonal anti-inhibin dapat diproduksi dari kelinci melalui penyuntikan berulang-ulang dengan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin.
2. Penyuntikan antibodi poliklonal anti-inhibin pada tikus putih dapat meningkatkan jumlah sel telur yang diovulasikan.
3. Pengenceran 1/10 dari antibodi poliklonal anti-inhibin dengan titer 20.480 adalah dosis terbaik yang memberikan respon tertinggi terhadap peningkatan jumlah sel telur yang diovulasikan dan responnya semakin menurun pada pengenceran 1/20 sampai 1/80.

6.2 Saran

Saran yang dapat disampaikan dari penelitian ini adalah:

1. Antibodi poliklonal anti-inhibin dapat digunakan untuk superovulasi pada tikus, perlu dipertimbangkan penggunaannya pada hewan ternak lain.
2. Perlu dipertimbangkan penggunaan antibodi poliklonal anti-inhibin terhadap resiko timbulnya reaksi sensitifitas,
3. perlu dipertimbangkan proses pembuatan, penyimpanan dan penggunaannya mengingat antibodi poliklonal anti-inhibin peka terhadap perubahan temperatur

RINGKASAN

MUHAMMAD MUFIDULKHOIR. Pengaruh Penyuntikan Antibodi Poliklonal Anti-Inhibin Terhadap Jumlah Sel Telur Tikus Putih (*Rattus norveicus*).

Antibodi poliklonal adalah antibodi yang dihasilkan dari proses imunisasi dengan sengaja terhadap hewan dengan menggunakan antigen tertentu dalam rangka untuk mendapatkan suplai antibodi dari serum hewan yang diimunisasi.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa antibodi poliklonal anti inhibin dapat diproduksi dengan cara menyuntikkan cairan folikel sapi bebas steroid yang mengandung inhibin yang ditambahkan dengan adjuvan secara berulang-ulang pada kelinci secara sub cutan. Dan antibodi yang dihasilkan diuji efektivitasnya dalam menginduksi peningkatan jumlah oosit yang diovulasikan pada tikus putih.

Hewan percobaan yang digunakan adalah 40 ekor tikus betina umur 2,5 – 3 bulan dibagi menjadi lima perlakuan masing-masing terdiri dari delapan ulangan. Perlakuan P₀ merupakan kontrol yang mendapatkan suntikan 0,2 ml NaCl fisiologis. Sedangkan perlakuan P₁, P₂, P₃, dan P₄, masing-masing mendapat suntikan antibodi poliklonal anti-inhibin sebanyak 0,2 ml dengan pengenceran 1/10, 1/20, 1/40, dan 1/80 pada titer 20.480.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa sampai pada pengenceran 1/80 titer 20.480 masih terjadi superovulasi dan semakin meningkat pada pengenceran 1/40 dan 1/20. Sedangkan pada pengenceran 1/10 titer 20.480 memberikan hasil tertinggi terhadap jumlah sel telur yang ovulasikan.

Berdasarkan hasil penelitian disarankan untuk menggunakan antibodi poliklonal anti-inhibin sebagai alternatif lain untuk superovulasi selain hormon PMSG dalam mendukung keberhasilan transfer embrio.

DAFTAR PUSTAKA

- Amstrong, D.T., B.G. Miller, E.A. Walton, A.P. Pfizner, and G.M. Warn. 1982. Endocrine Response of Follicles to PMSG and FSH. *Papers of Symposium Held at Canberra Australia*. P. 8-14.
- Austin, C.R. and R.V. Short. 1984. *Hormonal Control of Reproduction, Reproduction in Mammals*. Cambridge University Press. Sydney.
- Baker, H.J., J.R. Lindsey and S.H. Weisbroth. 1979. *The Laboratory Rat. Biology and Disease Vol. I* Academic Press Inc. Toronto.
- Bellanti, J.A. 1993. *Imunologi III*. Edisi Bahasa Indonesia. Gajah Mada Universitas Press. Yogyakarta.
- Beard, A.J., N. Groome and P.G. Knight. 1991. Estimation of Immunoreactive Inhibin Concentration in Bovine Ovarian Follicle Using a Level 2-Site Immunoradiometric Assay (IRMA) Specific for Diameric Inhibin. *J. Reprod. Fertil.* 40:25
- Braid, D.T., B.K. Campbell, G.E. Mann and A.S. Mc Nelly. 1991. Inhibin and Oestradiol in the Control of FSH Secretion in the Sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43:125-138.
- Breazile, J.L. 1971. *Textbook of Veterinary Physiology*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Campbell, B.K., R.J. Scaramuzzi, B.M. Gordon, C.G. Tsonis and J.A. Downing Csiro. 1991. Immunization against Inhibin Increases FSH Levels, Oestradiol Secretion and Follicular Development. *J. Reprod. Fertil* 8 : 16.
- Djojosebagio, S. 1996. *Fisiologis Kelenjar Endokrin*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Findlay, J.K., B.W. Doughton, C.G. Tsonic, R.W. Brown, J.W. Hunger, P.E. Greenwood and R.G. Forage. 1993. Inhibin as a fecundity vaccine. *J. Anim. Reprod. Sci.* 33 : 324-325.
- Findlay, J.K., S. Xiao and L. Shukovksi. 1990. The Role of Inhibin-related Peptides as Intra Gonadal Regulators. *J. Reprod.. Fertil. Dev.* 2:205-218.

- Glencross, R.G., E.C.L. Bleach, S.C. Wood and P.G. Knight. 1994. Active Immunization of Heifers Against Inhibin effects on Plasma Concentration of Gonadotrophins, Steroid and Ovarium Follicular Dynamics During Prostaglandin Synchronized Cycles. *J. Reprod. Fertil.* 100: 599-605.
- Goodman, J.W. Immunogens and Antigens. In Daniel P.S., I.T. Abba, and G.B. Tristan. Ed. Basic and Clinical Immunologi. Apleton and Lange. Norwalk, Conecticut.
- Guyton, A.C. 1983. Fisiologi Kedokteran II. Ed. V. Terjemahan Adji Dharma. EGC Jakarta. P. 442-455 ; 534-549.
- Hafez, S.S.E., 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hardjopranjoto, S., 1988. Fisiologi Reproduksi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Hardjopranjoto, S., 1992. Ilmu Kemajiran Pada Ternak, Penerbit Lab. Ilmu Kemajiran Jurusan Reproduksi dan kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Harlow, E. And D.Lane, 1988. Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Hinshelwood, M.M., F. Kamel, D.J. Diersehke and E.R. Hauser. 1991. Effect of Charcoal Extracted Follicular Fluid on Reproductive Function In Post Partum Cows Domestic Animal. *J. Endocrinology.* 8 (1) : 37-54.
- Ismudiono, 1996. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi Pertama. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Knight, P.G., R.J. Castilo, R.G. Glencross, A.J. Beard and J.H.M. Wrathall. 1990. Isolation of Bovine Ovarium Inhibin , Its Immunoneutralization in Vitro and Immunolocalization in Bovine Ovary. *Domestic Animal Endocrinology.* 7: 299-313.
- Kusriningrum, R.S. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Universitas Airlangga Surabaya. P. 56-95.
- Lunnenfel, B. and V.Inster. 1978. Diagnosis and Treatment of Functional Infertility. Grosse Verlag, Berlin. P.116.
- Mahaputra, L. 1992. Ilmu Kebidanan Veteriner I. Cetakan III. Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

- Mc. Donald, L.E. 1977. Hormone of The Pituitary Glands. In Jones, L.M., N.H. Broth and L.E. Mc Donald. Ed. *Veterinary Pharmacology And Therapeutic*. 4th.Ed. Lea and Febiger Philadelphia. pp. 32-279.
- O'Shea, T., L.J. Cummins, B.M. Bindon and J.K. Findlay. 1982. Increased Ovulation Rate in Ewes Vaccinated With an Inhibin Enriched Fraction from Bovine Follicular Fluid. *Proc. Aust. Sol. Reprod. Biol.* 14: Abstr.85.
- O'Shea, T., B.M. Bindon, M.A. Hillard, L.A. Piper, J.K. Findlay and K. Miyamoto. 1989b. Increase in Ovulation Rate in Merino Ewes After Active Immunization With Inhibin Preparations Obtained by Immuno-Affinity Chromatography. *J.Reprod. Fertil. Dev.* 1:347-355.
- Nalbandov.A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia Dan Unggas. Cet. I. Terjemahan; K.Sunaryo. Ed. III. Penerbit Universitas Indonesia.
- Norris, D.O. 1980. *Vertebrate Endocrinology*. Lea and Febiger. Philadelphia. pp. 346-348.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Ternak. Fakultas Kedokteran Veteriner. Jurusan Reproduksi Institut Pertanian Bogor. Penerbit Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Rantam, F.A., 2000. Teknologi ELISA, Model Elisa, Aplikasi dan Pengembangannya. Laboratorium Virologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Robertson, D.M., L.M.Foulds, F. de Vas, L. Leversha and D.M. de Kretser. 1990. Identification of Inhibin and Inhibin-Related Proteins in Human Follicular Fluid. *J. Reprod. Fertil. Dev.* 2:327-335.
- Salisbury, G.H. and N.L. Van Denmark. 1985. Fisiologi Reproduksi dan Iseminasi Buatan Pada Sapi. Diterjemahkan.Oleh Djanuar, R. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. PP. 49-55; 105-117.
- Smith. E., 1990. Prinsip Bioteknologi. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Smith, J.B. dan S. Mangkoewijaya. 1988. Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Ed. Pertama. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Smith, J.B., 1995. Produksi Serum Hiperimun. In. G.W. Burgess Ed. Teknologi ELISA Dalam Diagnosis dan Penelitian. James Cook University of North Queensland.

- Suwarno. 2000. Prinsip Dasar, Optimalisasi dan Interpretasi Hasil Uji ELISA. Laboratorium Virologi dan Imunologi. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
- Sukra, J. 1983. Pengantar Kuliah Embriologi. Institut Pertanian Bogor.
- Tizard, I. 1987. Veterinary Immunology in Introduction. 3th. Ed. W. D. Saunders Co. Philadelphia.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi Pertama. Angkasa Bandung.
- Toelihere, M.R. 1985. Ilmu Kebidanan Pada Ternak Sapi dan Kerbau. Penerbit Universitas Indonesia.
- Tomaszewka, M.K. , I.K.Sutama, I.G.Putu dan T.D.Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah laku dan Produksi Ternak di Indonesia. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Turner, C.D. dan J.T. Bagnara. 1988. Endocrinologi Umum. Penerbit Airlangga University Press. Surabaya. PP. 449-498; 564-615.
- Ward, D.N. and A.Steinberger. 1988. Inhibin in The Physiology of Reproduction. vol.I. Ed. by E.Knobil, J.D.Neill, L.L.Ewing, G.S.Greenwald, C.L.Market and D.W.Pfaf. Reven Press, New York.
- Widjaja, B.K.G. 1998. Imunologi Dasar. Edisi ke tiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1.

CARA KERJA SDS-PAGE

1. Membuat Running gelombang ultrasonic 12%

Acrylamide	2,5	ml
Tris Hcl Ph 8,8	1,2	ml
SDS 0,5%	1,2	ml
Aquadest	1,1	ml
Temed	50	µl
APS	30	µl
2. Masukkan lewat dinding sampai kira-kira 1cm dari atas.
3. Tambahkan butanol kira-kira 1 ml.
4. Biarkan 25 menit.
5. Membuat stacking gel

Acrylamide	0,66	ml
Tris Hcl Ph 6,8	0,8	ml
SDS 0,5%	0,8	ml
Aquadest	0,8	ml
Temed	4	µl
APS 10%	20	µl
6. Buang butanol jika gel sudah beku dan bersihkan, lalu masukkan stacking gel lewat dinding sampai penuh.
7. Masukkan combs dan biarkan 25 menit.
8. Ambil combs dan bersihkan dari sisa-sisa dengan E buffer.
9. Masukkan sampel kira-kira 15 µl yang telah di denaturasi dengan lamli buffer (panaskan 15 menit 100⁰C).
10. Ambil cetakan gel dan masukkan ke alat elektroforesis.
11. Jalankan listrik V: 125, MA: 40, 70 menit.
12. Setelah warna biru turun, matikan alat.

13. Ambil gel dan letakkan pada petridisc dan lakukan pencucian.
14. Pencucian I
 - Metanol 50 % (metanol 25 cc + Aquadest 25 cc)
 - Acetic acid 7,5 % (Acetic acid 3,75 cc + Aquadest 46,25 cc)
 - Goyang selama 30 menit.
15. Buang larutan tadi dan masukkan pencucian II:
 - Metanol 5% (metanol 2,5 cc + aquadest 47,5 cc)
 - Acetic acid 7,5% (Acetic acid 37,5 cc + Aquadest 46,25 cc)
 - Goyang selama 30 menit.
16. Buang larutan tadi dan masukkan pencucian III:
 - Glutaral dehid 10% (glutaral 10 cc + Aquadest 90 cc)
 - Goyang 30 menit.
17. Buang larutan tadi dan masukkan pencucian IV:
 - Aquadest 100 cc, goyang 30 menit.
18. Buang larutan tadi dan masukkan pencucian V:
 - Aquadest 100 cc, goyang 30 menit.
19. Buang larutan tadi dan masukkan pencucian VI:
 - Aquadest 100 cc, goyang 30 menit.
20. Buang larutan dan lakukan pewarnaan :
 - AgNo₃ (0,8 gram) + 4 ml DW, campurkan kedalam larutan :
 - NaOh 0,36% 21 ml
 - NH₃ 25% 1,4 ml
 - Aquadest 73,6 ml
 - Goyang 15 menit.
21. Cuci dengan aquadest 100 ml 2 kali masing-masing 2 menit.
22. Beri pengembang warna
 - Formaldehide 37% 50 µl
 - Asam sitrat 100 µl
 - Aquadest 100 µl
 - Tunggu 5 menit.
23. Stop reaksi dengan acetic acid 10% (1 cc as. Asetat + 9 cc Aquadest).

Lampiran 2.

CARA KERJA ELISA INDIKATIF UNTUK PEMERIKSAAN ANTI INHIBIN

1. Encerkan antigen inhibin dengan coating buffer, sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$. Masukkan 100 μl ke dalam setiap sumuran mikroplate ELISA
2. Inkubasi semalam (± 18 jam) pada suhu 4 $^{\circ}$ C
3. Cuci dengan NaCl - Triton lima kali
4. Tambahkan 150 μl blocking buffer (BSA) pada setiap sumuran
5. Inkubasi satu jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C
6. Cuci dengan NaCl - Triton lima kali
7. Encerkan antibodi kelinci anti inhibin (Ab₁, Ab₂, Ab₃, Ab₄, Ab₅, Ab₆, Ab₇, Ab_{mix}) dengan blocking buffer pada 1/10 dengan menggunakan tabung mikro. Encerkan lagi antibodi tersebut sehingga diperoleh pengenceran 1/40, 1/80,, 1/40.960 dengan menggunakan mikroplate lain (bukan mikroplate ELISA). Kemudian pindahkan:
 - Ab₁ pada baris A₂
 - Ab₂ pada baris B₂
 - Ab₃ pada baris C₂
 - Ab₄ pada baris D₂
 - Ab₅ pada baris E₂
 - Ab₆ pada baris F₂
 - Ab₇ pada baris G₂
 - Ab_{campuran} pada baris H₂
 - Ab_{kontrol negatif} pada baris A₁, B₁, C₁, D₁, E₁, F₁, G₁ dan H₁
 - PBS pada baris E₁₂ dan F₁₂
8. Inkubasi satu jam pada 37 $^{\circ}$ C
9. Cuci dengan NaCl - Triton lima kali

10. Encerkan konjugat goat-anti-rabbit yang dilabel enzim AP pada 1/2000 dengan blocking buffer. Tambahkan 100 μ l pada setiap sumuran
11. Inkubasi satu jam pada 37° C
12. Cuci dengan NaCl – Triton lima kali
13. Larutkan substrat 4-NPP dengan bufer substrat dan tambahkan 100 μ l pada setiap sumuran
14. Inkubasi 30-90 menit dalam ruang gelap pada suhu kamar atau 37° C
15. Hentikan reaksi dengan menambah larutan stopper 50 μ l pada setiap sumuran
16. Baca nilai absorban pada panjang gelombang 405 nm dengan ELISA reader
17. Interpretasikan hasilnya

Lampiran 3. Sidik Ragam Hasil Penghitungan Jumlah Sel Telur Tikus Putih

KEL.	PERLAKUAN					TOTAL
	P1 : 1/10	P2 : 1/20	P3 : 1/40	P4 : 1/80	P0: NaCl	
1	24	19	16	12	7	78
2	25	17	17	13	8	80
3	23	18	15	14	10	80
4	18	18	14	17	8	75
5	21	20	16	14	9	80
6	18	18	14	14	8	72
7	17	18	16	13	9	73
8	18	17	15	15	8	73
TOTAL	164	145	123	112	67	611
X	20,50	18,12	15,37	14,00	8,37	

$$FK = \frac{(611)^2}{40} = 9333,025$$

$$JKT = 10117 - 9333,025 = 783,975$$

$$JKP = \frac{80083}{8} - 9333,025 = 677,350$$

$$JKS = 783,975 - 677,350 = 106,625$$

SK	db	JK	KT	F hit	F tabel	
					0,05	0,01
Perlakuan	4	677,350	169,3375	55,586**	2,65	3,77
Sisa	35	106,625	3,0464			
Total	39	783,975				

Keterangan : F hitung > F tabel

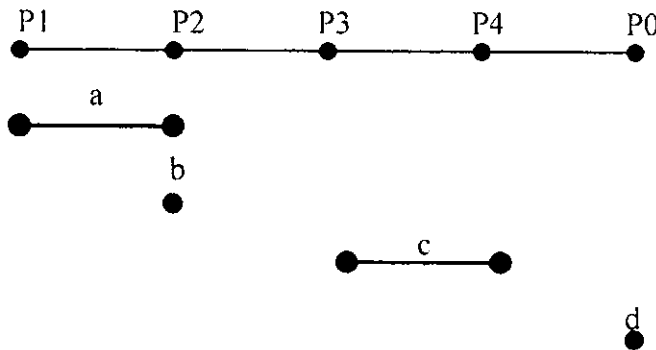
Bermakna H0 ditolak, H1 diterima.

Artinya lima jenis perlakuan tersebut memberikan perbedaan yang sangat nyata terhadap jumlah sel telur yang diovolasikan.

Selanjutnya diteruskan dengan uji BNT 1%

$$\begin{aligned}
 BNT\ 1\% &= t_{1-\alpha,(35)} \times \sqrt{\frac{2KTS}{n}} \\
 &= 2,724 \times \sqrt{\frac{2 \times 3,0464}{8}} \\
 &= 2,724 \times 0,8727 \\
 &= 2,3772
 \end{aligned}$$

Perlakuan	Rata-rata perlakuan X	Beda rata-rata				BNT 1%
		(X-P0)	(X-P4)	(X-P3)	(X-P2)	
P1 ^a	20,500	12,125*	6,5*	5,125*	2,375	2,3772
P2 ^{ab}	18,125	9,75*	4,125*	2,75*		
P3 ^c	15,375	7,0*	1,375			
P4 ^c	14,000	5,625*				
P5 ^d	8,375					



Keterangan:

Dari penghitungan sel telur menunjukkan perlakuan kontrol (P0) berbeda nyata dengan perlakuan 1, 2, 3 dan perlakuan 4. Tetapi perlakuan 1 tidak berbeda dengan perlakuan 2, perlakuan 2 berbeda dengan perlakuan 3, dan perlakuan 3 tidak berbeda dengan perlakuan 4.

Lampiran 4. Data Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Lama hidup	: 2-3 tahun, dapat sampai 4 tahun
Lama bunting	: 20-22 hari
Kawin sesudah beranak	: 1-24 jam
Umur disapih	: 21 hari
Umur dewasa	: 40-60 hari
Umur dikawinkan	: 10 minggu (\pm 2,5 bulan)
Siklus kelamin	: poliestrus
Siklus birahi	: 4-5 hari
Lama estrus	: 9-20 hari
Perkawinan	: Pada waktu estrus
Ovulasi	: 8-11 jam sesudah estrus, spontan
Fertilisasi	: 7-10 jam sesudah kawin
Berat dewasa	: 300-400 gram jantan, 250-300 gram betina
Berat lahir	: 5-6 gram
Jumlah anak	: rata-rata 9
Suhu (rektal)	: 36 ⁰ -39 ⁰ C (rata-rata 37 ⁰ C)
Puting susu	: 12 puting, 3 pasang didaerah dada dan perut.
Plasenta	: diskodal hemokorial
Uterus	: 2 kornua, bermuara sebelum servik