

Kajian Efek Terapi Antibodi Anti-Inhibin pada Hewan Spesies Sama Terhadap Timbulnya Antibodi Anti-Idiotipik

The Study of Therapeutic Effect of Antibody Anti-Inhibin to the Similar Species of Animal on the Risk of Its Anti-Idiotipic Antibody

Herry Agoes Hermadi¹, Suwarno², dan Kusnoto³

¹)Bagian Reproduksi; ²)Bagian Mikrobiologi; ³)Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Univeritas Airlangga, Surabaya.

Abstract

The objective of the study was to know the repeated of AAIn to the same species of animal were not induces AAId and total immunoglobulin productions. This study used 10 male rabbits divided into 4 groups as series trial. Each rabbit in groups I, II, III and IV was injected subcutaneously with 0.5 ml of 1:10 antibody anti-inhibin per animal one time; Group II rabbit are injected twice by using the same dosage antibody anti-inhibin single dose, twice, thrice, fourfold every two week respectively. The antibody anti-idiotypic was measured by using indirect ELISA. While the level of total immunoglobulins by using direct ELISA. The result of the study showed that repeated injections of rabbit antibody anti-inhibin were not stimulated antibody anti-idiotypic in the same species and the total immunoglobulins of rabbit were not decreased.

Key words: anti-inhibin, anti-idiotipic.

Pendahuluan

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 follikel 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 mencit 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 *fragment 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 netralisasi 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.

Metode Penelitian

Hewan Coba

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

Tahapan Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi lima tahap sebagai berikut.

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).

Perlakuan

Sebanyak 10 ekor 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), dengan 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.

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 AAIn (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).

Pengujian jumlah imunoglobulin total dengan ELISA langsung

Dua minggu pasca penyuntikan AAIn pada setiap frekuensi dilakukan pemeriksaan jumlah Ig total. Imunoglobulin (serum kelinci) perlakuan di-coating pada mikrolat 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.

Rancangan Penelitian dan Analisis Data

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

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).

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini hasil pengukuran kadar AAId pasca injeksi berulang dengan AAIn pada uji ELISA tak langsung dapat dilihat pada Tabel 1. Pada Tabel 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.

Pada Tabel 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.

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.

Tabel 1. Nilai OD dan Transformasi Pengukuran Kadar AAId (Pasca Injeksi Berulang dengan AAIn) pada Uji ELISA Tak-langsung

Frekuensi injeksi AAIn	Kadar AAId	
	Optical density (OD)	Transformasi Vy
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)	$1,434 \pm 0,020$	-
Phosphate buffer saline (PBS)	$0,013 \pm 0,003$	-

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

Tabel 2. Nilai OD dan Transformasi Pengukuran Jumlah Imunoglobulin Total (Pasca Injeksi Berulang dengan AAIn) pada Uji ELISA Langsung

Frekuensi injeksi AAIn	Kadar AAId	
	Optical density (OD)	Transformasi Vy
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)	$0,041 \pm 0,005$	-
Phosphate buffer saline (PBS)	$0,010 \pm 0,002$	-

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

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 untuk 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 negatif hormonal dan harganya jauh lebih murah dibandingkan dengan preparat hormon.

Kesimpulan

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-idiotipik; dan 2) Pemberian antibodi anti-inhibin dari kelinci ke kelinci tidak menekan jumlah imunoglobulin total.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan banyak terimakasih kepada pengelola dana "DIK Rutin dan DIK Suplemen" Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada kami untuk mendapatkan dana tersebut guna menyelesaikan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- 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*.
- 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.
- Hercowitz, MB. 1993. Imunofisiologi: Fungsi sel dan interaksi seluler dalam pembentukan antibodi. *Dalam: Imunologi III*. JA. Bellanti. Gajah Mada University Press, Yogyakarta. 126-172.
- 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: Immunochemistry*. MA. Kerr and R. Troope (Eds). Bios Scientific Publishers, Oxford, UK. pp. 43-62.
- 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.

Zainuddin, M. 2000. Metodologi Penelitian. Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.