

PROFIL TITER ANTISERUM-INHIBIN HASIL INDUKSI INHIBIN 32 kDa PADA KELINCI SEBAGAI KANDIDAT VAKSIN UNTUK INDUKSI SUPEROVULASI

PROFILE OF ANTIBODY TITRE AGAINST INHIBIN IN RABBIT FOLLOWING INDUCTION
OF INHIBIN 32 KDa AS VACCINE CANDIDATE FOR INDUCTION OF
SUPEROVULATION

T.N. Siregar¹, Aulanni'am², Y. Linggi³, G. Riady¹, Hamdan¹, dan T. Armansyah⁴

¹Jurusan Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

²Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

³Jurusan Reproduksi Fakultas Perikanan Universitas Nusa Cendana Kupang

⁴Jurusan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah mempelajari profil anti-inhibin hasil induksi inhibin 32 kDa dari sel granulosa folikel ovarium kambing pada kelinci. Penelitian ini dilakukan dalam 2 tahap yaitu 1) isolasi dan karakterisasi inhibin dari sel granulosa folikel ovarium kambing dan 2) karakterisasi anti-inhibin sebagai respon imun akibat induksi oleh inhibin. Karakterisasi inhibin dilakukan menggunakan teknik *sodium dodecyl sulphonat polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dan anti-inhibin dikarakterisasi menggunakan teknik *blotting* (*dot blot* dan *Western blot*) dan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Imunisasi 200 µl inhibin dilakukan dengan penambahan µl 200 *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan 200 µl *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) masing-masing untuk imunisasi primer dan *booster*. Serum dikoleksi setiap minggu selama 10 kali setelah *booster* I. Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa inhibin sel granulosa folikel ovarium kambing mempunyai BM 32 kDa. Imunisasi primer yang diikuti 2 kali *booster* menginduksi respon imun humoral yang ditandai dengan biosintesis anti-inhibin. Titer optimum dicapai pada pengambilan darah ke-8 (65 hari pasca imunisasi primer).

Kata kunci: inhibin, anti-inhibin, imunisasi, *booster*, titer

ABSTRACT

The objective of this research was evaluate the profil of anti-inhibin induced by inhibin 32 kDa isolated from goat granulosa on rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Two stages research were conducted : stage 1, isolation and characterization inhibin from goat granulosa and stage II, characterization of anti-inhibin. Characterization of inhibin was done by technique sodium dodecyl sulphonat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and anti-inhibin characterized by technique of dot blot, Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The rabbit were immunized by 200 µl inhibin with 200 µl *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) and 200 µl *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) for primary immunization and booster immunization, respectively. Serum were collected 10 times. SDS-PAGE revealed that inhibin have molecular weights of 32 kDa. Primary immunization and following by 2 times booster immunization induced biosynthesis of antibodies to inhibin and have optimum titre on 8th bleed (65 days after first immunization).

Key words: inhibin, anti-inhibin, immunization, booster, titre

PENDAHULUAN

Folikulogenesis adalah proses yang bertanggung jawab untuk perkembangan folikel ovulatori dan pelepasan satu atau lebih oosit pada interval tertentu pada keseluruhan siklus reproduksi hewan. Pertumbuhan dan perkembangan folikel dikontrol oleh sistem kompleks yang melibatkan sumbu hipotalamus-hipofisa-ovarium. Hormon gonadotropin mempunyai peran penting dalam kontrol tersebut.

Hormon gonadotropin yang terlibat dalam kontrol folikulogenesis adalah *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH). Hormon FSH berfungsi menginisiasi pertumbuhan folikel, sedang LH berfungsi menstimulasi pertumbuhan dan rupturnya folikel (Guerin, 2004). *Follicle stimulating hormone* adalah hormon gonadotropin yang disekresikan oleh hipofisa anterior dan sekresinya distimulasi oleh GnRH dari hipotalamus dan dihambat oleh hormon ovarium seperti hormon steroid dan inhibin. Inhibin adalah regulator utama sekresi FSH oleh hipofisa anterior pada berbagai mamalia (Alvarez *et al.*, 1998; Taya *et al.*, 1996).

Manipulasi untuk meningkatkan pertumbuhan folikel dan ovulasi dapat dilakukan dengan cara imunoneutralisasi terhadap inhibin. Inhibin dapat menimbulkan reaksi imun yang kuat dan antibodi inhibin (anti-inhibin) yang diberikan pada ternak akan dapat meningkatkan folikulogenesis melalui peningkatan sekresi FSH (Anderson *et al.*, 2003; Gibbons *et al.*, 1994). Terdapat 2 molekul yang berperan dalam menghambat sekresi FSH dalam fase folikuler yaitu estrogen dan inhibin (Findlay *et al.*, 1992; Kaneko *et al.*, 1995). Namun Taya *et al.* (1996) menegaskan bahwa inhibin merupakan inhibitor utama sekresi FSH, sedang estradiol beraksi sebagai signal maturasi folikel dan penentu waktu LH surge preovulatori. Oleh karena itu, imunoneutralisasi terhadap inhibin dengan cara imunisasi pasif menggunakan antibodi inhibin merupakan pertimbangan yang tepat untuk meningkatkan pertumbuhan folikel dan ovulasi.

Penggunaan inhibin sebagai imunogen ternyata dapat menginduksi terbentuknya antibodi (Sewani-Rusike dan Dakwa, 2000; Anderson *et al.*, 2003). Beberapa peneliti melaporkan variasi berat molekul (BM) inhibin, tetapi berat molekul inhibin yang matang adalah 32 kDa (Ireland *et al.*, 1994; Guthrie dan Garret, 2000; Myamoto *et al.* 1986). Dengan berat molekul 32 kDa maka protein inhibin dapat bertindak sebagai imunogen yang kuat. Nirwati (2005) menjelaskan syarat imunogenisitas yaitu keasingan, berat molekul, kompleksitas struktur kimia, konstitusi genetik, rute pemberian antigen dan dosis pemberian antigen. Selanjutnya dijelaskan bahwa protein dengan BM <10.000 dalton merupakan imunogen lemah sedang protein dengan BM >10.000 dalton merupakan imunogen kuat.

Mekanisme terbentuknya antibodi inhibin diduga melalui respon imun humoral. Respon imun humoral adalah respon terhadap imunogen yang ditandai dengan dihasilkannya antibodi terlarut yang diduga sebagai IgG karena IgG merupakan imunoglobulin yang dominan pada serum darah (Nirwati, 2005). Untuk tujuan pengembangan anti-inhibin menjadi kandidat vaksin maka diperlukan karakterisasi terhadap anti-inhibin tersebut yang dapat bermanfaat untuk produksinya.

MATERI DAN METODE

Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE

Persiapan gel. *Plate gel* dibuat dengan merangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat ± 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*).

Separating gel dibuat dengan mencampurkan semua bahan kecuali *ammonium persulfate* (APS) dan *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine* (TMEDA), kemudian didegas selama 10 menit. APS dan TMEDA ditambahkan dan dikocok sebentar kemudian dimasukkan ke dalam *plate* dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras.

Stacking gel dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas dan setelah *separating gel* mengeras, larutan *stacking gel* dituangkan di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat elektroforesis set mini protein gel, dan *running buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Injeksi Sampel. Sampel yang berisi 12,5 μL sampel sel granulosa dan 12,5 μL *running sampel buffer* (RSB) dipanaskan dalam penangas air pada suhu 100°C selama 2 menit, setelah didinginkan sampel siap dimasukkan dalam sumur-sumur gel dengan volume 10 μL untuk tiap sumur. Untuk protein standar diperlakukan sama. Setelah itu anoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian bawah dan katoda dihubungkan dengan *reservoir* bagian atas. *Power supply* dihubungkan dengan listrik dengan arus listrik sebesar 30 mA 600 volt selama 2-3 jam. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda $\pm 0,5$ cm dari batas bawah *plate gel*.

Perlakuan setelah *running*. Gel hasil *running* direndam dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30 menit. Kemudian dicuci dengan 150 mL asam asetat dan direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan asam asetat sampai bening dan dilanjutkan air. Perlakuan di atas menggunakan penggoyang otomatis (*shaker*).

Penentuan Massa Molekul Relatif (Mr) Protein dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul glikoprotein, dilakukan dengan menghitung Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita sesuai menurut Sumitro *et al.* (1996). Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini didapatkan persamaan reaksi dan ditentukan massa molekul relatif sampel.

Produksi anti-inhibin

Isolat inhibin hasil elusi diimunisasikan pada 8 ekor kelinci. Sebanyak 200 μL isolat inhibin ditambah dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1:1 dan divortex (± 30 menit) sampai terbentuk emulsi.

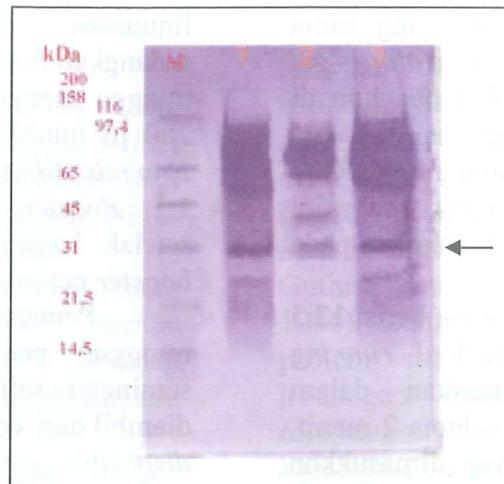
Imunisasi dilakukan secara subkutan, sedangkan *booster* pertama dilakukan setelah 4 minggu penyuntikan pertama menggunakan 200 μL inhibin ditambah dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1. *Booster* kedua dilakukan minggu ke-6 setelah *booster* pertama dengan cara seperti *booster* pertama.

Pemanenan darah dilakukan setiap minggu, pengambilan pertama dilakukan seminggu setelah *booster* I. Darah kelinci diambil dari vena auricularis marginalis dengan *disposable syringe*. Darah kelinci diinkubasi pada temperatur ruang ± 10 menit, disentrifugasi 3000 *rpm* selama 15 menit, kemudian diambil supernatannya.

Serum yang diperoleh dipurifikasi dengan ammonium sulfat dengan kejenuhan 50%. Serum ditambah ammonium sulfat dengan perbandingan 1:1, divortex 3 kali tiap 10 menit dan selama proses disimpan pada suhu rendah. Selanjutnya disentrifugasi kembali 3000 *rpm* selama 20 menit pada suhu 4°C , supernatan dibuang dan presipitat ditambah dengan ammonium sulfat dengan perbandingan 1:10. Selanjutnya, disentrifugasi 3000 *rpm* selama 20 menit, supernatan dibuang dan presipitat dilarutkan dengan buffer fosfat 0,05 M pH 7 (1:1). Setelah divortex dimasukkan dalam selofan, kemudian didialisis dengan 0,01 M buffer fosfat pH 7 pada suhu rendah (dalam kulkas) selama semalam.

Uji Spesifisitas Anti-inhibin dengan Inhibin Dot Blot

Membran hasil SDS-PAGE digunakan untuk deteksi imunologik inhibin. Membran dilepaskan pada ikatan antibodi oleh inkubasi dalam buffer stripping (100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7) pada suhu 50°C selama 30 menit, dan dicuci dua kali dalam TBS (10 mM Tris, 150 mM NaCl) berisi 0,1% Tween 20 (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK). Setelah dicuci, kemudian diinkubasi selama 1 jam dalam larutan blocking (5% dry milk, 0,2% Ninidet P40 dalam TBS) yang disuplementasi dengan antiserum-inhibin. Setelah dicuci dua kali dengan TBS-Tween 20 dan diinkubasi



Gambar 1. Elektroforegram inhibin (M = Marker, \diamond BM Inhibin = 32 kDa)

dalam larutan blocking yang disuplementasi dengan antiserum-inhibin, membran kemudian diinkubasi selama 1 jam dengan antibodi sekunder peroksidase-konyugasi goat anti-rabbit IgG (Institut Pasteur, Paris, France). Terjadinya reaksi spesifitas antara antigen (inhibin) dengan antibodi terhadap native (anti-inhibin) ditentukan melalui terbentuknya noda biru keunguan.

Western Blot

Membran hasil SDS-PAGE dalam kondisi tereduksi ditransferkan pada membran nitroselulosa. Membran diblok dengan 3% BSA dalam 20 mM Tris-Cl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama 1 jam. Selanjutnya, diinkubasi dalam Tris yang mengandung 1% BSA dengan anti-inhibin sebagai antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05% Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti-rabbit IgG dalam AP dengan pengenceran 1:1000) dan ditambahkan substrat Western Blue.

Pengukuran titer anti-inhibin

Untuk mengetahui titer anti-inhibin digunakan metode indirect ELISA seperti yang dianjurkan oleh Rantam (2003). Microplate 96 well dicoating dengan inhibin sebanyak 100 μ L, kemudian diinkubasikan pada suhu 4 $^{\circ}$ C selama 24 jam. Kemudian dicuci dengan 0,05% PBS-

Tween 20 sebanyak 6 kali dan diblok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1%, yang kemudian dicuci seperti pola di atas. Setelah itu, direaksikan dengan anti-inhibin sebanyak 100 dan diinkubasikan pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci lagi 6 kali dan direaksikan dengan antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG AP Conjugated* dan diinkubasikan pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 1 jam. Kemudian dicuci dan akhirnya ditambahkan substrat pNPP dan jika warna pada kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil titer anti-inhibin akan dibaca pada ELISA reader (Bio-rad).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat Molekul Inhibin

Hasil elektroforesis SDS-PAGE membuktikan bahwa glikoprotein inhibin dapat diisolasi dari sel granulosa seperti yang terlihat pada Gambar 1. Pada Gambar 1 tersebut menunjukkan adanya pita molekul protein dengan berat molekul (BM) 32 kDa yang diyakini sebagai molekul inhibin.

Hasil SDS-PAGE (Gambar 1) sel-sel granulosa memperlihatkan beberapa pita protein. Pada penelitian ini hanya pita protein yang mempunyai berat molekul 32 kDa yang dijadikan isolat inhibin. Pertimbangan ini didasarkan atas banyaknya variasi berat molekul inhibin yang kemungkinan tergantung

pada spesies hewan. Secara umum, semua mamalia mempunyai molekul inhibin yang matang dengan berat molekul 32 kDa. Meskipun hasil *Western blot* crude sel granulos dengan inhibin 32 kDa ditemukan beberapa pita protein yang diduga juga merupakan protein inhibin dengan BM yang berbeda (data tidak disajikan). Hal ini didasarkan penelitian Myamoto *et al.* (1986) yang menemukan 6 bentuk molekul inhibin dari cairan folikel sapi yakni 120, 108, 88, 65, 55, dan 32 kDa. Pada penelitian lain pada sapi, Ireland *et al.* (1994) menemukan 8 bentuk berat molekul inhibin yakni 29, 34, 48, 58, 68, 77, 122, dan >160 kDa. Selanjutnya Guthrie dan Garrett (2000) menemukan 4 bentuk berat molekul pada babi, yakni 69, 121, 227, dan >227 kDa. Variasi inhibin ini kemungkinan berhubungan dengan status folikel yang digunakan sebagai sumber inhibin pada stadium reproduksi dan sumber inhibin yang akan diisolasi.

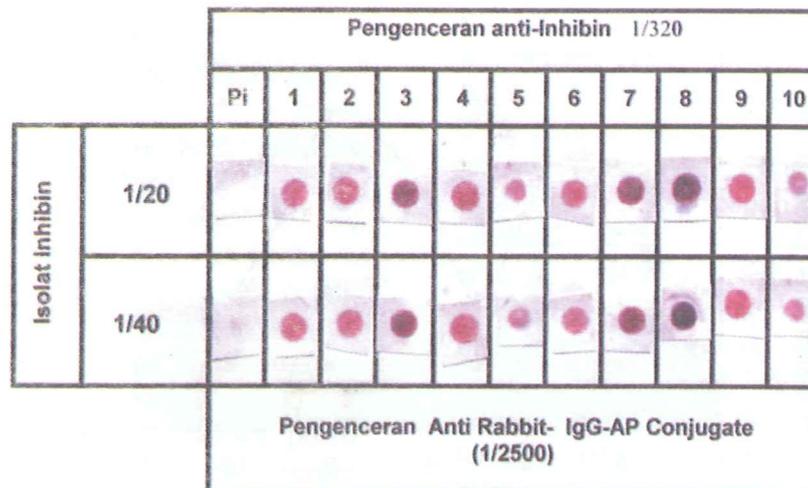
Uji spesifisitas dengan teknik *Western blot* diketahui bahwa anti-inhibin mengenali suatu protein inhibin dengan berat molekul 32 kDa. Meskipun terdapat beberapa bentuk molekul inhibin, tetapi Woodruff dan Mayo (1990) menegaskan bahwa bentuk matang

molekul inhibin adalah 32 kDa yang terdiri dari suatu rantai α (18 kDa) dan suatu rantai β (14 kDa) yang dihubungkan oleh jembatan sulfida. Bentuk inhibin matang berasal dari proses proteolitik molekul inhibin yang lebih besar.

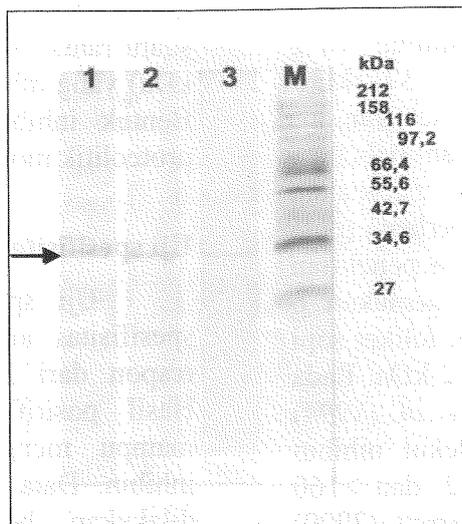
Uji spesifisitas anti-inhibin dengan inhibin

Uji spesifisitas bertujuan mengetahui spesifisitas antibodi (imunoglobulin) sebagai respon dari imunisasi inhibin pada kelinci. Hasil positif menunjukkan bahwa inhibin mampu menginduksi dan mengenali anti-inhibin. Data uji spesifisitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metode *dot blot*. Keberadaan anti-inhibin pada serum darah kelinci diperiksa mulai koleksi darah ke-1-10. Koleksi serum darah dimulai 2 minggu setelah *booster* I. Data yang dihasilkan berupa visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (inhibin) dengan antibodi (anti-inhibin) berupa noda kebiruan terlihat pada Gambar 2.

Hasil *dot blot* memperlihatkan adanya reaksi antigen inhibin dengan antibodi terhadap inhibin. Pada serum darah preimun tidak menunjukkan adanya reaksi antigen dengan antibodi. Hal ini membuktikan bahwa pada



Gambar 2. Uji spesifisitas anti-inhibin dengan inhibin menggunakan metode Dot Blot



Gambar 3. Uji Western Blot molekul inhibin terhadap anti-inhibin

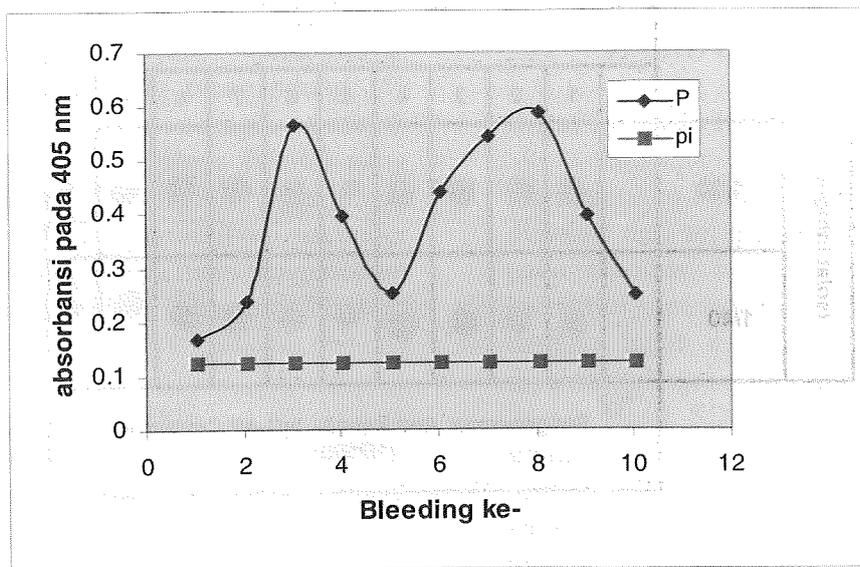
Keterangan: (M= Marker Protein, 1, 2, 3= Sampel inhibin, → = Pita inhibin yang dikenali oleh anti-inhibin)

serum darah preimun tidak terdapat anti-inhibin.

Perbedaan intensitas warna ungu pada Gambar 2 menunjukkan perbedaan konsentrasi anti-inhibin yang bereaksi dengan inhibin. Pengenceran inhibin antara 1/20 dengan 1/40 tidak menunjukkan intensitas yang berbeda, tetapi waktu koleksi serum darah menunjukkan

intensitas warna yang berbeda. Intensitas warna ungu tertinggi terdapat koleksi darah ke-8 setelah *booster* I. Koleksi darah ke-8 berarti minggu ke-3 setelah *booster* II.

Untuk mengetahui bahwa molekul inhibin yang mempunyai berat molekul 32 kDa bereaksi spesifik dengan antibodi hasil induksinya dilakukan dengan metode *Western*



Gambar 4. Profil anti-inhibin pada kelompok kelinci (p=perlakuan, pi=preimun)

blot. Hasil *Western blot* menunjukkan bahwa anti-inhibin mengenali suatu protein inhibin dengan berat molekul 32 kDa (Gambar 3).

Profil titer inhibin

Antiserum inhibin yang dihasilkan dari induksi inhibin pada kelinci diukur dengan metode *indirect* ELISA. Penelitian dilakukan dengan menyuntikkan inhibin yang telah dicampur dengan CFA dan IFA masing-masing untuk imunisasi primer dan sekunder (*booster* I

meningkat lagi hingga koleksi darah ke-8 dan mulai menurun lagi pada koleksi darah ke-9. Hasil pengukuran titer anti-inhibin mencapai puncaknya pada koleksi darah ke-8. Nilai titer serum preimun tampak berupa garis datar dengan nilai absorbansi 0,126. Pada sapi, nilai titer mencapai maksimum setelah diimunisasi dengan isolat inhibin 32 kDa dicapai pada hari ke-7 sampai dengan 21 pasca *booster* (Morris *et al.*, 2002).

Data lengkap titer anti-inhibin dari ELISA *reader* diringkas pada Tabel 1.

Tabel 1. Pembentukan anti-inhibin setelah penyuntikan isolat inhibin pada kelinci

| Koleksi darah ke- Pasca Booster | Rerata Nilai Titer (Pengenceran 1/160) | SD |
|---------------------------------|--|--------|
| 1 | 0,168 | 0,0910 |
| 2 | 0,238 | 0,1762 |
| 3 | 0,567 | 0,7210 |
| 4 | 0,339 | 0,1328 |
| 5 | 0,253 | 0,4207 |
| 6 | 0,441 | 0,7602 |
| 7 | 0,546 | 0,3904 |
| 8 | 0,588 | 0,6721 |
| 9 | 0,399 | 0,5584 |
| 10 | 0,252 | 0,5205 |

dan II). Titer anti- inhibin diukur berdasarkan nilai absorbansi 405 nm pada ELISA *reader*. Gambar 4 adalah hasil titer antibodi (IgG) terhadap inhibin pada kelompok kelinci dengan pengenceran 1/320.

Hasil pengukuran absorbansi ELISA dengan pengenceran anti-inhibin 1/10, 1/20, 1/40, 1/160, 1/320, 1/640, dan 1/1280 menunjukkan pola profil titer anti-inhibin sebanding dengan besar pengenceran. Pengukuran titer dengan pengenceran sampai dengan 1/1280 masih dapat dibaca profil titernya.

Gambar 4 menunjukkan bahwa profil titer anti-inhibin yang diperoleh dari serum kelinci yang diinduksi oleh inhibin meningkat dari koleksi darah ke-2 hingga ke-3 dan menurun pada koleksi darah ke-4 dan ke-5. Pada koleksi darah ke-6 titer anti-inhibin

Gambar 4 menunjukkan adanya perbedaan titer anti-inhibin dari hewan coba kelinci yang mendapat imunisasi dengan inhibin dibandingkan dengan serum preimun. Nilai titer serum preimun tampak berupa garis datar dengan nilai rerata absorbansi 0,126. Hal ini mengindikasikan bahwa induksi inhibin akan memberikan respon dengan terbentuknya antibodi inhibin. Peningkatan induksi pada penelitian ini mulai terlihat pada koleksi darah ke-2. Setelah koleksi darah ke-3 titer mengalami penurunan dan meningkat lagi mulai koleksi darah ke-6. Perlakuan waktu *booster* sudah tepat karena pada saat *booster* tersebut titer antibodi yang dihasilkan dari injeksi pertama sudah rendah. Kurniawati (2004) berpendapat bahwa perlakuan *booster* pada saat titer tinggi mengakibatkan antigen yang masuk akan ditangkap oleh antibodi yang ada.

Pada koleksi darah ke-4 titer anti-inhibin sudah mengalami penurunan. Penurunan titer antibodi disebabkan oleh adanya mekanisme kontrol dalam pembentukan antibodi. Mekanisme kontrol tersebut adalah berkurangnya kadar antigen, pengaturan oleh idiotip, dan penekanan oleh sel T penekan (Kresno, 1996).

Titer anti-inhibin pada koleksi darah ke-6 meningkat lagi setelah *booster* ke-2 dan mencapai titer tertinggi pada koleksi darah ke-8. Peningkatan tersebut berlangsung lebih lama dibanding setelah *booster* pertama yakni bertahan mulai koleksi darah ke-6 sampai dengan koleksi darah ke-8. Peningkatan titer antibodi ini sesuai dengan pendapat Kresno (1996) yang menyatakan bahwa peningkatan tersebut karena adanya respon sekunder. Ciri khas respon sekunder adalah pembentukan imunoglobulin berlangsung lebih cepat dan untuk waktu yang lebih lama, imunoglobulin mencapai titer tertinggi, dan imunoglobulin terutama terdiri atas IgG. Adanya respon sekunder pertama, kedua, dan seterusnya yang diberikan melalui *booster* akan menyebabkan proliferasi sel memori berlangsung lebih cepat sehingga membentuk antibodi yang lebih tinggi dan lebih lama.

Imunisasi kelinci dengan isolat inhibin akan memberikan respon dengan terbentuknya anti-inhibin. Pembentukan anti-inhibin akibat induksi dengan cairan folikel sapi bebas steroid dilaporkan oleh Sewani-Rusike dan Dakwa (2000) pada tikus jantan dan betina. Selanjutnya, Anderson *et al.* (2005) menyatakan bahwa isolat peptida berukuran 32 kDa dapat digunakan sebagai imunogen yang dibuktikan dengan terbentuknya antibodi terhadap inhibin.

Induksi anti-inhibin diduga melalui respon imun humoral. Respon imun spesifik terbagi atas 2, yakni respon imun humoral dan respon imun seluler. Respon imun humoral adalah respon terhadap imunogen ditandai dengan dihasilkannya antibodi terlarut. Respon imun dimulai dengan aktivitas *antigen-presenting cell* (APC) yang memproses antigen sehingga menimbulkan interaksi dengan sel-sel sistem imun. Sel-sel ini berfungsi menyajikan

antigen kepada sel limfoid yang tersensititasi. Sel APC dipresentasikan bersama *major histocompatibility complex* (MHC) kelas II agar antigen dikenali oleh limfoid. Signal ini akan dibawa ke T-penolong (CD4+) melalui reseptor TcR, yang kemudian memberikan sinyal kepada sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Akhirnya, sel B berdiferensiasi menjadi satu populasi (klon) sel plasma yang memproduksi dan melepaskan antibodi spesifik ke dalam darah (Kresno, 1996).

Antibodi yang terbentuk diduga sebagai IgG karena IgG merupakan imunoglobulin yang dominan pada serum darah. Imunoglobulin IgG terdapat dalam darah dalam kurun waktu yang lama (3-10 minggu), IgA berumur 6 hari, IgD berumur 3 hari, IgE berumur 2 hari dan IgM berumur 5 hari (Subowo, 1993).

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Inhibin yang berasal dari sel granulosa folikel ovarium kambing mampu menginduksi terbentuknya anti-inhibin pada kelinci.
2. Profil titer anti-inhibin mulai muncul pada koleksi darah ke-1 (2 minggu setelah *booster* I) dan titer puncak dicapai pada koleksi darah ke-8 (3 minggu setelah *booster* II).

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan dana melalui Dana Penelitian Hibah Bersaing XIII Tahun Anggaran 2005 sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, R.H., de Carvalho, J.B.V., Rosa, A. Silva, E. Perone, C.N. Ribela, M.T.C.P. and de Oliveira Filho, E.B. 1998. Endocrine profiles and ovulation rate of cows superovulated with FSH following passive immunization against steroid

- free-bovine follicular fluid. *Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 35(6):34-45.
- Anderson, S.T., Bindon, B.M., Hillard, M. A. and O'Shea, T. 2003. Increased ovulation rate in Merino ewes immunized against small synthetic peptida fragments of the inhibin alfa subunit. *Reproduction, Fertility and Development* 10(5):421-432.
- Findlay, J.K., Robertson, D.M., Clarke, I.J. Klein, R. Doughton, B.W. Xiao, S. Russel, D.L. and Shukovski, L. 1992. Hormonal regulation of reproduction-general concepts. *Anim. Reprod. Sci.* 28:319-328.
- Gibbons, J.R., Beal, W.E. Krisher, R.L. Faber, E.G. Pearson, R.E. and Gwazdauskas, F.C. 1994. Effects of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, 42:405-419.
- Guerin, J.F. 2004. Folliculogenesis and Ovulation. http://www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Contents.html
- Guthrie, H.D., dan Garrett, W. 2000. Physiology and expression of inhibin/activin transcripts and different molecular forms of inhibin protein during follicle in pigs. *Agricultural Research Service* (Abstract).
- Ireland, H.J.L., Good, T.E., Knight, P.G. and Ireland, J.J. 1994. Alterations in amounts differents forms of inhibin during follicular atresia. *Biol. Reprod.* 50:1265:1276.
- Kaneko, H., Kishi, H. Watanabe, G., Taya, K. Sasamoto, S. and Hasegawa, Y. 1995. Changes in plasma concentration of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J. Reprod. Dev.* 42:311-320.
- Kurniawati, M. 2004. *Analisis titer antibodi bZP3 hasil induksi bZP3 pada kera.* Thesis. PPS Universitas Brawijaya, Malang.
- Kresno, S.B. 1996. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.* Ed. 4 Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Morris, D.G., Hyne, A., Kane, M.T., Diskin, M.G. and Sreena, J.M. 2002. Control of ovulation rate in beef cattle. Irish Agriculture and Food Development Authority. <http://www.teagasc.ie/publications/index.htm>
- Myamoto, K., Hasegawa, Y. Fukuda, M. and Igarashi, M. 1986. Demonstration of high molecular weight forms of inhibin in bovine follicular fluid by using monoclonal antibodies to bFF 32 K inhibin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136(3):1103-1109.
- Nirwati, K. 2005. *Antigen-Antibodi.* Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Rantam, F.A. 2003. *Metode Imunologi.* Airlangga University Press
- Sewani-Rusike, C.R and Dakwa, C. 2000. Fertility in rats immunized with steroid-bovine follicular fluid. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 67:257-262.
- Subowo. 1993. *Imunobiologi.* Angkasa, Bandung.
- Sumitro, B.S., S. Rahayu, Fatchiyah dan S.Widyarti, 1996. *Materi Kursus Teknik-teknik Dasar Analisa Protein dan DNA.* Jurusan Biologi, FMIPA, Unibraw, Malang, hal. 25-26.
- Taya, K., Kaneko, H. Takedomi, T. Ishi, H. and Watanabe, G. 1996. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and

folliculogenesis in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 42:563-570.

Woodruff, T.K., and Mayo, K.E. 1990. Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. *Annu.Rev.Physiol.* 52:807-821.