

Preparasi Anti –Hy sebagai Bahan Baku Semen Beku dan Embrio Beku Berjenis Kelamin Betina

Anti Hy Preparation as Raw Material For Frozen Semen and Frozen Female Embryos

¹Husni Anwar, ¹P Srinto, ²WM Yuniarti

¹ PPDH Fakultas Kedokteran Hewan Unair

² Fakultas Kedokteran Hewan Unair

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya-60115.

Telp. 031-5992785 Ext 303, Fax. 031-5993015

Email : pudjisananto@yahoo.com

Abstract

This study was aimed to :1) produce anti HY protein/HY antisera by means of synthesising from the spleen of male rabbit before weaning age,2) define if this HY antibody could be generated by the immunization of adult male rabbit and 3) to examine biologically to define the sex ratio shift on the pups born. Experimental animal used were male rabbit at preweaning age and adult male rabbits subyected to immunization using spleen suspension. Serum was purified using SAS method, followed by dialysis and the level of anti HY antibody was measured using Biuret method. Result of this research showed that from approximately 15 ml serum from week-7 bleeding after the addition of SAS in a ratio of 1:1 which were then homogenized using vortex, finally resulted approximately 4 ml precipitate (semi-solid fom), then from BSA standard curve and the absorbance value, it was shown that the level of anti HY antibody was 21825 µg/ml.

Keywords : HY antigen, HY antibody, Sex determination

Pendahuluan

Pada ternak, khususnya pada sapi potong dan sapi perah spermatozoa yang mengandung kromosom X dan kromosom Y sangat menentukan jenis kelamin anak yang akan dilahirkan setelah terjadinya proses fertilisasi. Pada ternak potong, diharapkan anak yang lahir adalah jantan, sedangkan pada sapi perah anak yang lahir diharapkan betina.

Berbagai upaya telah dilakukan oleh pemerintah dalam mencukupi kebutuhan protein bagi masyarakat di Indonesia. Bioteknologi reproduksi adalah salah satu upaya pemerintah untuk memenuhi kebutuhan akan protein tersebut yang sampai saat ini bisa diterima oleh peternak di Indonesia adalah teknik / program inseminasi buatan. (Dirjen Peternakan, 2005). Melalui penggunaan teknologi inseminasi buatan, disamping dapat meningkatkan populasi ternak juga dapat memperbaiki mutu genetik ternak di Indonesia khususnya sapi potong, sapi perah, yang juga dapat meningkatkan efesiensi reproduksi pada ternak (Hafez, 2000).

Berbagai upaya telah banyak dilakukan penelitian tentang separasi sperma berkromosom X dan Y, antara lain melalui teknik penyaringan dengan sephadex, elektroforesis, berdasarkan berat molekul sperma X dan Y, sentrifugasi, tapi hasilnya masih tidak optimal. (Hafez, 2000).

Perkembangan gonad menjadi testis, ternyata ada faktor HY antigen yang terdapat pada selaput membran gonad dan pada kromosom Y terdapat *histocompatibility Y* (HY Antigen) yang mempengaruhi deferensiasi sel sel gonad untuk berproliferasi menjadi testis dan sel Leydig mampu menghasilkan hormon testosteron yang merangsang perkembangan saluran Wolf menjadi saluran kelamin jantan dan proses spermatogenesis. (Knobil *et al.*, 1988).

Pada semua fetus mammalia, perkembangan jenis kelamin berasal dari adanya primordial gonad. Primordial gonad mempunyai kemampuan untuk berdeferensiasi menjadi testis atau ovarium dan untuk menjadi testis harus ada HY-antigen, adanya HY-antigen ini juga harus ada kromosom Y, dimana HY-antigen terdapat pada kromosom Y. Secara genetik, fetus jantan, yaitu adanya Y kromosom berisi sebuah gene yang mengkode proteinyang disebut HY-antigen yang disekresikan sejak awal perkembangan embrio. Dimulainya sekresi HY-antigen pada awal perkembangan embrio, maka primordial gonad akan menjadi testis, jika tidak ada sekresi HY-antigen, maka primordial gonad akan menjadi ovarium.

Demonstrasi ditunjukkan oleh Goldberg dkk. (1971), menunjukkan bahwa antigen-HY bisa ditentukan dengan metode serologis dan status seks kromosomnya. Wachtel dkk. (1975) memberikan bukti bahwa antigen-HY bekerja seperti hormon, bahwa

pada mamalia pada masa embrional antigen HY merangsang gonad primor-dial berdeferensiasi menjadi testis pada jantan dan menekan pertumbuhan dari ovarium.

Pada mamalia, secara normal antigen HY diproduksi oleh banyak tipe sel jantan, bukan sel betina. Antigen-HY bisa mengikat ke permukaan sel melalui dua cara penempelan, yaitu : a). Ke tempat tempat anchorage yang berkaitan dengan dimerisasi dari kompleks histocompabilitas utama (MHC) dan beta 2-mikroglobulin (gene loci untuk MHC dikenal sebagai HLA-A,-B, dan -C pada pria, H-2D dan H-2K pada tikus). b). Pada reseptor spesifik pada gonad untuk antigen-HY. (Knobil *et.al.*, 1988).

Unit usaha produksi semen beku di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang selama ini sudah memproduksi semen beku khususnya semen beku sapi potong dan sapi perah dan sudah dipasarkan di Jawa Timur khususnya, dapat diharapkan mampu menghasilkan semen beku pilih kelamin dikemudian hari.

Dengan demikian, penelitian tentang preparasi anti HY ini dapat diharapkan menunjang produksi semen beku yang nantinya peternak dapat memilih semen beku pilih kelamin.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, tepatnya di eks. Laboratorium Fisiologi Reproduksi, untuk pemeliharaan kelinci dan imunisasi, sedangkan dan purifikasi serum dan pengukuran konsentrasi protein dengan metode Biuret di lakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan sejak bulan Juni-Oktobre 2011.

Bahan Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan, alko-hol, kapas, pakan kelinci, Complete Freund's Adjuvant, Incomplete Freund's Adjuvant, SAS 50 % (*Saturated Ammonium Sulphate*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7, Tween 100, PMSF (*Poly Methyl Sulfonyl Floride*), Casein, Na₃N (*Sodium Azid*), Buffer Tris-glisin, glisin, asam sitrat, bisakrilamid, poliakrilamid, mercap-toethanol, amonium persulfat, Commasie Brilian Blue R250, Kloroform, etanol, BSA (*Bovine Albumin Serum*), asam asetat, glutaraldehid, NaBH₄, MgCl₂, methanol, BaCl₂, NaCl, NaOH, Alkalin fosfatase, Substrat western blue, Mem-bran Nitrosellulosa, blotto dan ddH₂O. Larutan stok BSA, CuSO₄ dan NaOH.

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain kandang hewan coba untuk kelinci, spuit, sentrifus, sonikator, shaker, microtome, boks preparat, timbangan, tabung reaksi, *refrigerated centri-*

fuge, freezer, autoclaf, peralatan gelas, peralatan seksi, vaccutainer, oven, mikros-kop optik, *gamma counter*, neraca analitik, pH meter, Biorad elektroforesis, Dot-blotter, vortex, micro tip, mikropipet, kolom kromatografi, tabung dialisis dan *cryostat* dan spektrofotometer

Imunisasi Hewan coba.

Sebelum imunisasi, dibuat suspensi limpa kelinci jantan yang belum lepas saph, dengan menggerus limpa tersebut kemudian ditambahkan larutan PBS sebanyak 10 cc, disentrifus pada 2000 rpm selama 10 menit, endapan dibuang, supernatan dire-sentrifus pada 4500 rpm selama 20 menit. Pellet (endapan) diambil dan supernatan dibuang.

Imunisasi dilakukan dengan menambahkan larutan PBS sebanyak 5 cc kedalam pellet, kemudian di mixer sampai rata selanjutnya dilakukan imunisasi pada kelinci jantan dewasa dengan dosis 0,3 cc + 0,7 cc CFA secara subkutan.

Imunisasi ini diulang setiap minggu dengan dosis yang sama tanpa CFA, selama 4 minggu, dan pada minggu kelima sampai minggu keenam dilakukan booster dengan dosis 0,3 cc + 0,7 cc IFA.

Preparasi serum

Pengambilan darah untuk memperoleh anti-HY dilakukan melalui *arteri auricularis* pada kelompok kelinci lokal jantan yang telah di induksi dengan isolat HY dengan menggunakan jarum suntik *disposable* masing-masing pada minggu ke-5 dan minggu ke-6 setelah imunisasi, kemudian dilakukan pemisahan serum dengan metoda sentrifugasi (1500 rpm selama 20 menit). Presipitat dibuang, supernatannya dipindahkan ke dalam *microtube* dan disimpan pada suhu -5 derajat Celcius.

Purifikasi Anti- HY dari Serum

Serum ditambah dengan SAS 50% dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama beberapa menit. Serum disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Supernatan dibuang, presipitat dicuci dengan SAS 50% (10x volume pelet), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7 sampai volume 1 ml. Dilanjutkan dialisis dalam 0,01M buffer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4°C .

Hasil dan Pembahasan

Sebelum imunisasi, dibuat suspensi limpa kelinci jantan yang belum lepas saph, dengan menggerus limpa tersebut kemudian ditambahkan larutan PBS sebanyak 10 cc, disentrifus pada 2000 rpm selama 10 menit, endapan dibuang, supernatan

diresentrifus pada 4500 rpm selama 20 menit. Pellet (endapan) diambil dan supernatan dibuang.

Imunisasi dilakukan dengan menambahkan larutan PBS sebanyak 5 cc kedalam pellet, kemudian di mixer sampai rata selanjutnya dilakukan imunisasi pada kelinci jantan dewasa dengan dosis 0,3 cc + 0,7 cc CFA secara subkutan.

Imunisasi ini diulang setiap minggu dengan dosis yang sama tanpa CFA, selama 4 minggu, dan pada minggu kelima sampai minggu keenam dilakukan booster dengan dosis 0,3 cc + 0,7 cc IFA. Selanjutnya dilakukan analisa dengan metode dot blotting dilanjutkan dengan proses purifikasi dengan metode BIURET secara diskriptif. Pengambilan darah dilakukan pada minggu ke-4, saat pemberian booster pertama, darah selanjutnya diambil serumnya, dilakukan purifikasi, datah diambil melalui vena auricales.

Dari sekitar 15 cc serum hasil bleeding pada minggu ke – 7 setelah penambahan SAS dengan perbandingan 1:1 kemudian dihomogenasi dengan menggunakan vortex akhirnya diperoleh presipitat sekitar 4 cc (bentuk setengah padat)

Kurva standar BSA			
[BSA] ppm	Absorbansi		
	1	2	Rata-rata
0	0	0	0
1000	0,01	0,01	0,01
2000	0,05	0,06	0,06
3000	0,09	0,12	0,11
4000	0,13	0,13	0,14
5000	0,18	0,19	0,19
6000	0,24	0,24	0,24
7000	0,31	0,31	0,31
8000	0,32	0,32	0,33
9000	0,40	0,39	0,39
10000	0,43	0,44	0,44

Biosintesis anti H-Y dilakukan pada kelinci jantan yang diimunisasi dengan gerusan limpa dari kelinci jantan yang belum lepas susu dalam ajuvan CFA kemudian dilakukan booster sebanyak 3 kali

Sampel	Absorbansi		Absorbansi rata-rata	konsentrasi Protein (ppm)
	1	2		
Kelinci	0.093	0.101	0.097	21825

$$\begin{aligned}
 y &= 4.10^{-5} x \\
 0,097 &= 4.10^{-5} x \\
 x &= 2425 \text{ ppm} \\
 [\text{protein}] &= 2425 \text{ ppm} \times \text{faktor pengenceran} \\
 [\text{protein}] &= 250 \text{ ppm} \cdot 9 \\
 &= 21825 \text{ ppm} \\
 &= 21825 \mu\text{g/mL}
 \end{aligned}$$

dalam ajuvan IFA, kemudian pengambilan datah dilakukan sebanyak 7 kali, serum yang didapatkan kemudian dilakukan purifikasi untuk meningkatkan kuantitas antibodi yang diinginkan (Bollag and Edelstein, 1991).

Hasil Dot Blot dan pengukuran protein dengan metode Biuret menunjukkan bahwa dalam serum terdapat antibodi terhadap H-Y antigen yang telah dibuktikan mempunyai spesifitas dengan antigen yang digunakan sebagai bahan induksi. Austyn dan Wood (1993) menyebutkan bahwa untuk memproduksi antisera dapat dilakukan imunisasi berulang pada kelinci yang hasilnya kemudian disebut dengan antibodi dari antigen yang diberikan. Selanjutnya disebutkan juga bahwa mekanisme terbentuknya antibodi dapat dijelaskan sebagai berikut antigen non spesifik akan masuk kedalam tubuh dan akan dikenali oleh *antigen presenting cell* yang berikatan dengan sistem *Major Histocompatibility Complex II* (MHC II) dalam hal ini adalah sel denrit yang akan mengaktivasi sel T. Sel T kemudian menjadi aktif dan akan mengeluarkan sitokin (IL-2) yang berakibat pada aktifnya sel T_h . Sel ini kemudian akan menyebabkan sel B memproduksi IgG dalam plasma. Demikian juga dengan pengukuran protein dengan metode Biuret, yang bertujuan juga untuk mengukur spesifitas anti H-Y pasca induksi, pengukuran metode biuret dapat menunjukkan kadar anti H-Y yang disintesis pada imunisasi dengan menggunakan gerusan limpa kelinci jantan yang diduga mengandung HY antigen Hal ini sesuai dengan pendapat Darnell *et al.* (1990) yang menyebutkan bahwa minggu pertama dan kedua setelah penyuntikan antigen, konsentrasi IgG dalam serum akan meningkat dan kemudian akan meningkat lebih tajam pada minggu kelima setelah pemberian *booster* pada minggu ketiga akibat telah terbentuknya sel memori yang cukup banyak untuk memproduksi IgG. Selanjutnya disebutkan pula bahwa bila konsentrasi antibodi dalam tubuh masih tinggi dan dilakukan imunisasi maka antigen yang masuk segera diikat oleh antibodi yang beredar dalam darah.

Kesimpulan

Purifikasi serum dengan menggunakan metode SAS yang kemudian dilanjutkan dengan teknik dialisis dapat meningkatkan perolehan antibodi anti HY dengan kadar protein yang diukur dengan metode Biuret sebesar 21825 µg/mL

Daftar Pustaka

- Andonian, L., MB Eslami, AA Muhammadi, J Akbarzadeh, HR Soleimanpour, DD Farhud, 2001. Preparation of HY Antibody in Female Mice as a Model for Sex Pre-selection. *Iranian Journal Publ.Health*, Vol. 30, Nos, 1-2.
- Anonimous, 1995. Balai Embrio Ternak Departemen Pertanian Direktorat Jenderal Peternakan. Jakarta
- Anzar, M., He, L., M.M. Buhr, T.G. Kroetsch and K.P. Pauls. 2002. Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and Its Relationship with Fertility. *J. Biol. Reprod.* 66, 354-360
- Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Cetakan pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Hal 16 – 22
- Aulanni'am, 2005. Protein dan Analisisnya. Cetakan pertama. Penerbit Citra Mentari Group. Malang. Hal. 19-27
- Booman P, L Kruijt, R Veerhuis, A.M Hengst, M Tieman, FE Ruch. 1989 . Sexing
- Bovine Embryos with Monoclonal Antibodies Against the HY Antigen. *Livestock Production Sciences*, 23 .p.1-16.
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay, 1992. *Applied Animal Reproduction*. 3th. Edition Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Bunch, D., L. Leyton and P. Saling. 1992. Sperm Interaction with The Zona Pellucida : Role of a Tyrosine Kinase receptor for ZP3 in Fertilization and Contraception. Schering Foundation Workshop 4 (ed. E Nieschlag and U.F. Habenicht). Pp. 367-381.
- Darnell, J., H. Lodish and D. Baltimore, 1990. *Molecular of Biology*. 2nd. edition. Sci. Am. Books. Pp 491-527
- Direktorat Jendral Peternakan, 2005. Panduan Lomba dan Kontes Ternak Nasional dalam rangka Pekan Peternakan Unggulan Nasional 2005. Direktorat Jendral peternakan Departemen Pertanian. Hal. 1
- Gordon, I., 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. The UK. University Press. Cambridge
- Hafez, E.S.E., 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Hunter, RHF., 1995. *Fisiologi dan Teknologi Hewan Betina Domestik*. Penerbit ITB Bandung.
- J.C. Gardon, S. Aquera, F. Castejon. 2004. Sexing in-vitro produced bovine embryos, at different stages of development, using rat HY - antiserum. *Theriogenology*. vol. 62. july.
- Knobill, E., and DN Jimmy, 1980. *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1 Raven Press, New York.
- K. Utsumi. 1991. Sexing of rat embryos with antisera specific for male rats. *Journal zoology experimental*. vol. 260 (1).
- Pablo, E.V., J.L. Bailey, G.D. Moore, Dieyun Pan, P.O. Clarke and G.S. Kopf. 1995. Capatitation of Mouse Spermatozoa : Correlation Between The Capatitation State and Protein Tyrosine Phosphorylation Development 121. 1129-1137.
- Susilawati, T. 2000. Analisis Membran Spermatozoa Sapi Hasil Filtrasi Sephadex dan Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. Disertasi Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Tanaka H., Herliantien, E. Herwiyanti, O.P. Lubis, Buwono dan J. Pujianto., 2002. *Reproduksi Klinik. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project*. Japan International Cooperation Agency. Hal. 2.
- Veerhuis R, PJM Hendriksen, AM Hengst, L Kruijt, M Tieman, P Booman. 1994. The Production of anti HY monoclonal antibodies their Potential use in a sex test for Bovine embryos. *Veterinari Immunology and Immunopathology* Vol. 42.