

Penghambatan Proliferasi Limfosit Mencit Balb/c oleh Ekstrak Testis Sapi Bali: Peran TGF- β

Suppression of Balb/c Lymphocyte Proliferation by Bali Cattle Testis Extracts: The Role of TGF- β

S.N. Depamede* & A. Rosyidi

Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas Peternakan, Universitas Mataram
Jln. Majapahit No. 62 Mataram NTB
(Diterima 11-12-2008; disetujui 12-03-2009)

ABSTRACT

Testis extract (ET) of several animals such as rats, mice, boars, and bulls, has been reported able to suppress lymphocyte proliferation. In order to elucidate if ET of bali cattle has the suppressive activity, the present study was conducted. ET was isolated aseptically from the testis of bali cattle slaughtered at a slaughter house in Mataram, Lombok. After decapsulating, the testis were minced, homogenized (1 g tissue per 3 ml phosphate buffered saline, PBS, pH 7.2). The ET (40, 20, and 10 μ g/ml) was added on to lymphocytes isolated from Balb/c spleen, then cultured for 72 hours in RPMI media containing 10% foetal bovine serum in 96 well plates with the concentration of 250,000 cells per well, with- or without concanavalin A (10 μ g/ml), or IL-2 (0.2 ng/ml). After 72 h of culture, cell proliferation was examined by colorimetric assay. The results showed that bali cattle ET were able to suppress the proliferation of lymphocytes *in vitro* through the process of apoptosis. Western blot analysis revealed that bali cattle ET contain TGF- β 1. The suppression effects of the ET were eliminated by anti-TGF- β 1 antibody. It can be concluded that ET of bali cattle expressed TGF- β which inhibited lymphocyte proliferation through an apoptotic cell mechanism. The actual roles of TGF- β in the bali cattle testis need to be elucidated further.

Key words: bali cattle testis, lymphocyte, proliferation, TGF- β 1, apoptosis

PENDAHULUAN

Testis, otak, dan *anterior chamber* mata dinyatakan sebagai lokasi pada tubuh hewan sebagai tempat yang memiliki keistimewaan imunologis (immune privileged sites), kare-

na dapat menerima cangkok jaringan asing (Streilein, 1995). Hal ini disebabkan testis memiliki suatu senyawa yang mampu menghambat kerja sistem imun pada testis (Maddocks & Setchell, 1990; Hedger *et al.*, 1998, Hedger & Meinhardt, 2003; Depamede, 2006; Foulds *et al.*, 2008). Senyawa atau faktor immunosupresan tersebut antara lain *activin* (Hedger *et al.*, 1990), *transforming growth factor beta*, TGF- β (Pollanen *et al.*, 1993), dan *fas ligand* (Bellgrau *et al.*, 1995).

*Korespondensi:
Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Fakultas
Peternakan, Universitas Mataram
Jln. Majapahit No. 62 Mataram NTB
Tlp. 0370-633603; e-mail: depamede@yahoo.com

Bahan bioaktif immunosupresan ditemukan pada testis beberapa hewan-ternak seperti mencit (Emoto *et al.*, 1990), tikus (Pollanen *et al.*, 1988; Depamede, 2006); dan sapi (Pollanen *et al.*, 1989; Foulds *et al.* 2008). Sejauh ini bahan bioaktif immunosupresan yang berasal dari cairan *vesica seminalis* babi jantan sudah diisolasi dan dikarakterisasi secara ekstensif (Veselsky *et al.*, 2003).

Penelitian tentang potensi testis beberapa ternak lokal sebagai sumber bahan immunosupresan di Indonesia masih jarang dilakukan, sedangkan di negara lain penelitian yang dilakukan sudah mengarah pada uji potensi bahan bioaktif immunosupresan asal testis sebagai bahan pengganti obat-obat immunosupresan (Sanberg *et al.*, 1996; Dufour *et al.*, 2003). Sebagai contoh, Dufour *et al.* (2003) berhasil mempertahankan cangkok sel-sel sertoli dari testis babi (porcain) pada bagian kapsul ginjal tikus (cangkok xenografts) untuk waktu lebih dari dua bulan tanpa penggunaan obat immunosupresan.

Indonesia kaya akan sumber daya hayati dengan keanekaragaman flora dan faunanya, salah satunya adalah sapi bali (Handiwirawan & Subandriyo, 2004). Potensi sapi bali lebih dilihat sebagai penyedia daging dan sumber tenaga kerja, sementara sebagai sumber potensi biologis lainnya seperti sebagai sumber senyawa bioaktif masih belum banyak diteliti. Secara ekonomis, testis sapi bukan merupakan produk utama dan hanya sebagai *by product* dari ternak sapi, sementara itu Pollanen *et al.* (1989) melaporkan bahwa testis sapi mempunyai potensi sebagai sumber bahan bioaktif immunosupresan. Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak kasar testis sapi bali memiliki potensi sebagai immunosupresan (Depamede & Rosyidi, 2007). Namun demikian, faktor apa yang paling berperan pada proses penghambatan dan bagaimana mekanismenya masih belum diteliti.

Proliferasi limfosit mencit Balb/c dalam tulisan ini dilaporkan dihambat secara *in vitro* oleh TGF beta yang terdapat pada ekstrak testis sapi bali. Mekanisme penghambatan tersebut melalui proses apoptosis. Hasil penelitian

ini dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut, baik dalam upaya menemukan bahan immunosupresan baru, maupun dalam mengkaji peran TGF beta secara *in vivo* pada sistem reproduksi sapi, khususnya pada sapi bali.

MATERI DAN METODE

Penyiapan Ekstrak Testis (ET)

Ekstrak testis disiapkan menurut Depamede (2006) dengan beberapa modifikasi, dari testis sapi bali umur sekitar satu tahun berdasarkan pertumbuhan geligi yang dipotong di rumah potong hewan Mataram, NTB. Testis utuh beserta skrotum segera dimasukkan ke dalam termos yang berisi bongkahan batu es dan dibawa ke Laboratorium Immunobiologi Universitas Mataram. Testis dicuci dengan air es, kemudian disemprot dengan alkohol 70%. Setelah skrotum dibuang, testis yang terbungkus kapsul *tunica albuginea* dicuci dengan *phosphate buffered saline* (PBS 0,15 M; pH 7,2) steril dingin di dalam kabinet steril. Testis tanpa lapisan *tunica albuginea* ditimbang dan ditambahkan PBS steril sebanyak 3 ml per 1 g testis, kemudian dihomogenasi pada suhu 0 °C. Hasil homogenasi disentrifugasi dua tahap, masing-masing pada kecepatan 3000 x g, 5 °C, 15 menit, kemudian supernatannya disentrifugasi pada 12.000 x g, 5 °C, 30 menit. Supernatan terakhir ditampung sebagai ekstrak testis (ET), kadar protein total ditera menggunakan UV-Vis spektrofotometer (Shimadzu, UV-160 PC) pada panjang gelombang 280 nm, dan *bovine serum albumin* (Sigma) digunakan sebagai standar. ET kemudian dilarutkan dan disimpan beku pada suhu -20 °C untuk digunakan pada perlakuan selanjutnya.

Isolasi Limfosit Mencit Balb/c

Sel limfosit diisolasi dari limpa mencit Balb/c umur 6-8 minggu dalam suasana aseptik menurut Depamede (2006). Sel-sel limpa diambil dengan cara menoreh salah satu ujung limpa dan menyutikkan medium RPMI (Gibco, BRL) ke bagian ujung lain dari limpa yang

diletakkan pada cawan petri yang berisi medium RPMI. Sel-sel yang diperoleh ditampung dalam tabung kemudian disentrifus (Labofuge 400 Heraeus Instruments) pada 2000 x g selama 5 menit pada suhu kamar. Pelet yang terbentuk disuspensikan dengan larutan NH_4Cl 0,17 M sebanyak 5 ml/1 limpa, untuk melisis sel-sel darah merah selama 5 menit, pada suhu kamar. Selanjutnya disentrifugasi 2000 x g, 5 menit, pada suhu kamar, kemudian larutan NH_4Cl dan lisat sel-sel darah merah dibuang. Pelet berupa sel-sel limfosit dicuci dengan medium RPMI sebanyak dua kali dengan cara sentrifugasi 2000 x g, 5 menit, pada suhu kamar. Limfosit yang telah dicuci diresuspensi dengan medium tumbuh yaitu RPMI yang mengandung *fetal bovine serum* 10%, antibiotik penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gibco, BRL), dan L-glutamin 2 mM (Gibco, BRL).

Uji Penghambatan dan Netralisasi Penghambatan Proliferasi Kultur Limfosit

Uji ini dilakukan menurut Veselsky *et al.* (2003) dan Depamede (2006) dengan beberapa modifikasi. Pengujian dilakukan dengan cara mengkultur 25×10^4 sel limfosit per sumuran plat mikro 96 sumuran (Nunc Clone). Sebagai kontrol proliferasi tanpa perlakuan, ke dalam sumuran yang telah terisi sel limfosit ditambahkan *concanavalin A* (Con A, Type V-A, Sigma) atau rekombinan murin interleukin 2 (IL-2, BioVision) masing-masing dengan konsentrasi akhir 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 0.2 ng/ml sebagai pemicu proliferasi. Selain ditambahkan Con A atau IL-2, untuk perlakuan penghambatan oleh ET, ke dalam sumuran yang telah berisi sel limfosit juga ditambahkan ET dengan konsentrasi 40, 20, dan 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Uji netralisasi atau anulir penghambatan dilakukan dengan menambahkan anti TGF- β 1 *polyclonal antibody* (BioVision) yang spesifik terhadap TGF- β 1 bovine, dengan konsentrasi akhir 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ke dalam sumuran yang berisi sel limfosit, Con A, dan ET (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Volume final setiap sumuran adalah 200 μl pada semua pengujian. Plat mikro yang telah berisi sel kemudian

diinkubasikan di dalam inkubator CO_2 dengan kandungan gas CO_2 5%, suhu 37 °C, selama 72 jam.

Deteksi Proliferasi Sel

Proliferasi sel dideteksi dengan metode perubahan warna (colorimetric assay) yang dikembangkan oleh Mossmann (1983) menggunakan larutan metiltiazoltetrazolium (MTT, Sigma) dalam larutan PBS. Bagi sel yang mengalami proliferasi, mitokondrianya akan menyerap MTT sehingga sel-sel tersebut akan berwarna ungu gelap akibat terbentuknya kristal tetrazolium (Mossmann, 1983). Berdasarkan prinsip ini, empat jam menjelang masa 72 jam inkubasi, plat mikro kultur dikeluarkan dari inkubator CO_2 . Masing-masing sumuran diberi 20 μl (100 μg) larutan MTT, kemudian kultur sel dikembalikan ke dalam inkubator. Sebanyak 200 μl medium dari setiap sumuran pada akhir masa inkubasi total 72 jam, secara hati-hati diaspirasi menggunakan pipet mikro. Selanjutnya ke dalam tiap-tiap sumuran tersebut ditambahkan 100 μl isopropanol yang mengandung 0,04 N HCl untuk meresuspensi kristal tetrazolium yang terbentuk. Setelah kristal larut, terbentuk larutan berwarna ungu dengan intensitas sebanding dengan tingkat proliferasi sel. Intensitas ini diukur menggunakan ELISA *photoreader* (MRX-II, Dynex Technology) pada panjang gelombang 570 nm. Sel pada kondisi tertentu dibiarkan tidak dilarutkan untuk difoto di bawah mikroskop (Inverted Microscope, Olympus).

Analisis Keberadaan TGF- β 1 pada ET

Keberadaan TGF- β 1 pada ET dianalisa menggunakan *western blot system* berdasarkan Depamede (2004) dan Spee *et al.* (2005) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 10 μl ET dicampur (1:1) dengan *loading buffer* (2% 2-merkaptotanol, 10% gliserol, 0,1% bromofenol blue, 4% SDS, dan 100 mM Tris-Cl), dipanaskan 95 °C, 3 menit, kemudian 5 μl campuran dimasukkan ke dalam sumuran 12,5% gel poliakrilamida (SDS-PAGE). Sebagai

marker bobot molekul protein, digunakan Pre-stained SeeBlue[®] marker (Invitrogen), sebanyak 5 µl per sumuran. Gel kemudian diset pada elektroforesis kit (BioRad) dengan aliran listrik 40 mA per gel selama 45 menit. Selanjutnya pita-pita protein dari gel ditransfer ke membran *nitrocelulose Hybond-C Extra* (Amersham Biosciences) menggunakan alat semi-dry Trans-Blot[®] SD (BioRad) sesuai prosedur manufaktur, dengan aliran listrik 10 V, selama 60 menit. Membran nitrocelulosa kemudian *diblocking* menggunakan larutan buffer *blocking* 5% susu skim dalam *tris buffered saline* (TBS) pH 7,5 yang mengandung 0,05% *tween* 20 (TBST) pada suhu kamar selama 60 menit dengan agitasi ringan (35 rpm pada alat Orbital Shaker, Thermolyne). Setelah empat kali pencucian menggunakan TBST, membran nitrocelulosa diinkubasikan dalam larutan antibodi primer (rabbit anti TGF-β1, BioVision; spesifik terhadap TGF-β1 bovine) dengan konsentrasi 2,5 µg/ml, selama 60 menit, suhu kamar, dengan agitasi ringan.

Membran nitrocelulosa kemudian diinkubasikan dalam konjugat antibodi sekunder (anti-rabbit IgG alkalin phosphatase conjugate, Sigma) dengan pola pencucian yang sama pasca inkubasi dengan konsentrasi sesuai petunjuk manufaktur (pengenceran 30 ribu kali dalam larutan bloking), 60 menit, suhu kamar, dan agitasi ringan. Pasca inkubasi dan prosedur pencucian, membran nitrocelulosa dimasukkan ke dalam larutan substrat NBT/BCIP (Roche) dengan konsentrasi 200 µl/10 ml Tris-HCl 0,1 M, pH 9,5 sebagaimana disarankan manufaktur. Reaksi antara TGF-β1 + rabbit anti TGF-β1 + *anti-rabbit conjugat* + NBT/BCIP dihentikan dengan mengangkat membran dari larutan NBT/BCIP saat terbentuk warna ungu-kehitaman dengan latar belakang warna nitrocelulosa stabil (putih-kelabu). Hasil reaksi kemudian didokumentasikan baik langsung dari membran, maupun melalui pemotretan.

Uji Apoptosis

Pengujian apoptosis menggunakan *Quick Apoptotic DNA Ladder Detection*

Kit (BioVision), sesuai dengan prosedur manufaktur. Prinsip kerja kit ini merupakan proses isolasi dan analisis DNA dari sel. Sel yang mengalami apoptosis akan memberikan pola pemisahan atau fragmentasi oligosoma berupa *ladder* (Ioannau & Chen, 1996). Sel dari kultur limfosit 72 jam, baik yang hanya terdiri atas sel yang distimulasi Con A, atau Con A dan ET (20 µg/ml), IL-2, atau IL-2 dan ET (20 µg/ml) dipanen dan disentrifusi 500 x g. Sebanyak 10⁶ sel dari masing-masing perlakuan atau kontrol, dicuci dengan PBS, kemudian dilisiskan, dan direaksikan dengan komponen yang tersedia dalam kit. DNA yang diperoleh disuspensikan dalam DNA suspension buffer yang disediakan manufaktur, dan sebanyak 5 µl dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa 1,2% yang mengandung 0,5 µg/ml etidium bromida, selanjutnya diseting pada alat elektroforesis (BioRad) dengan aliran listrik 70 V selama 45 menit. Marka yang digunakan DNA lambda (TakaRa). Hasil elektroforesis divisualisasikan pada UV-transiluminator dan didokumentasikan dalam bentuk foto.

Analisis Data

Data kuantitatif ditabulasi dan dianalisa berdasarkan Kaps & Lamberson (2004) dan Depamede (2006), dengan perhitungan *arithmetic mean* (mMean±SE). Nilai proliferasi sel disajikan dalam per sen (%) proliferasi. Nilai absorbansi pada OD 570 yang diperoleh dari sel-sel yang dikultur dengan faktor stimulan (ConA atau IL-2), tanpa penambahan ET, digunakan sebagai kontrol proliferasi 100%. Uji beda antara kontrol dan perlakuan, atau antar kelompok perlakuan dilakukan berdasarkan *unpaired student's t test* atau ANOVA (nilai P≤0,05 dinyatakan beda bermakna secara statistik). Data kualitatif ditampilkan dalam bentuk visual (foto).

HASIL DAN PEMBAHASAN

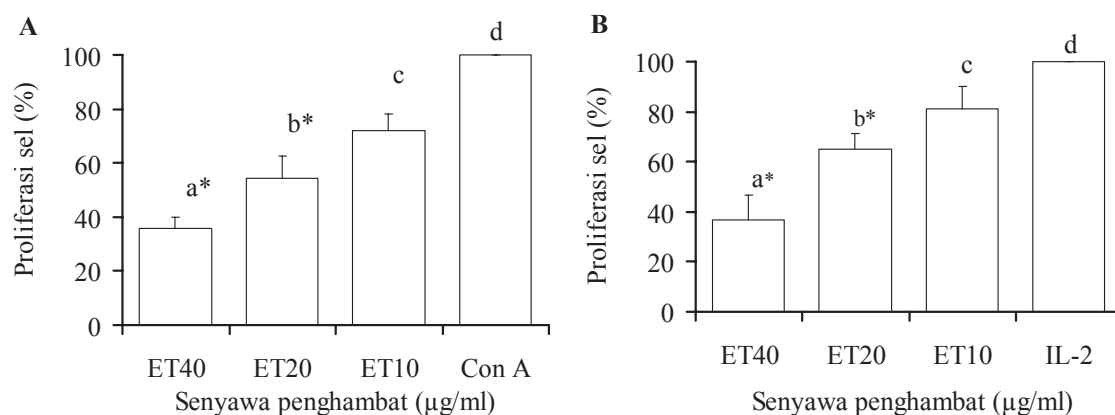
Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak testis (ET) sapi bali dapat menghambat

proliferasi kultur sel limfosit mencit Balb/c sesuai dengan konsentrasi ET. Penghambatan ini terjadi baik pada kultur limfosit yang dipacu oleh *concanavalin* A maupun oleh interleukin 2 (Gambar 1) hingga pada konsentrasi 10 $\mu\text{g/ml}$. *Concanavalin* A dan IL-2 diketahui memiliki potensi sebagai pemicu proliferasi sel-sel limfosit terutama sel-sel T (Adolfsson *et al.*, 2001). Faktor penghambat yang terdapat pada ET sapi bali adalah komponen atau faktor yang memiliki kemampuan menghambat proliferasi sel-sel T. Hal ini sejalan dengan hipotesa bahwa cangkok jaringan *xenograft* pada testis dapat bertahan lebih lama dibanding bagian tubuh yang lain, seperti di bagian subkutan atau bagian kulit sebagai akibat adanya substansi khusus (imunosupresan) yang disekresikan oleh testis dengan menghambat proliferasi sel-sel T (Maddocks & Setchell, 1990; Hedger & Meinhardt, 2003).

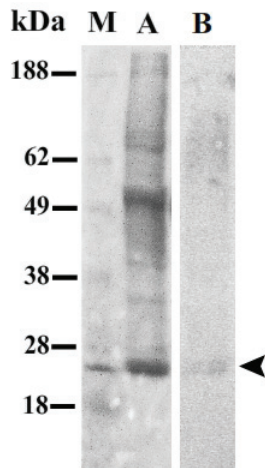
Penelitian imunosupresan pada testis sapi masih sangat jarang dilaporkan, kecuali oleh Pollanen *et al.* (1989) pada ekstrak testis sapi di Australia, hanya saja tidak ada lagi publikasi lebih lanjut tentang penelitian tersebut. Kelompok peneliti ini kemudian lebih fokus pada ekstrak testis rodensia, hingga kemudian disimpulkan bahwa pada testis rodensia faktor dominan yang berperan dalam penghambatan proliferasi limfosit secara *in vitro* adalah TGF- β (Pollanen *et al.*, 1993). TGF- β dengan bobot molekul 25 kDa, merupakan glikoprotein yang

terdiri atas dua monomer yang digabungkan oleh ikatan disulfida dan disintesa sebagai prekursor-prekursor besar, dan merupakan anggota dari keluarga molekul-molekul pensignal, serta berperan sangat penting pada pengaturan pertumbuhan dan fungsi hampir semua sel (Kingsley, 1994; Robertson *et al.*, 2002; Konrad *et al.*, 2000; Haagmans *et al.*, 2003; Hedger *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2006). Lebih lanjut Robertson *et al.* (2002) mengungkapkan bahwa pada hewan jantan, sekitar 25% TGF- β 1 yang terdapat pada seminal plasma ditemukan dalam bentuk aktif, sementara yang terdapat di dalam serum ditemukan dalam bentuk laten sebagai kompleks α -2-macroglobular. TGF- β 1 yang terdapat pada cairan *vesica seminalis* bergantung pada testosteron. Hal ini terlihat dari penurunan konsentrasinya pada hewan kastrasi (Robertson *et al.*, 2002). Keterkaitan antara keberadaan TGF- β 1 dan testosteron menunjukkan adanya hubungan erat fungsi TGF- β 1 pada testis dan fungsi testis sebagai penghasil sperma dan proses reproduksi hewan jantan (Xu *et al.*, 2003).

Pertama-tama dilakukan analisis keberadaan TGF- β 1 pada ET sapi bali untuk mengetahui kemungkinan TGF- β 1 berperan pada proses imunosupresan pada ET sapi bali. Hasil analisa menggunakan *western blot* menunjukkan bahwa peptida tersebut dengan bobot molekul 25 kDa ditemukan pada ET (tanda panah pada Gambar 2). Selanjutnya



Gambar 1. Proliferasi sel-sel limfosit yang dikultur dengan Con A (A) atau IL-2 (B) dengan atau tanpa ekstrak testis (ET) sapi bali pada beberapa konsentrasi. Superskrip berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$); * berbeda nyata ($P < 0,01$) terhadap kontrol (Con A atau IL-2); $n=4$.

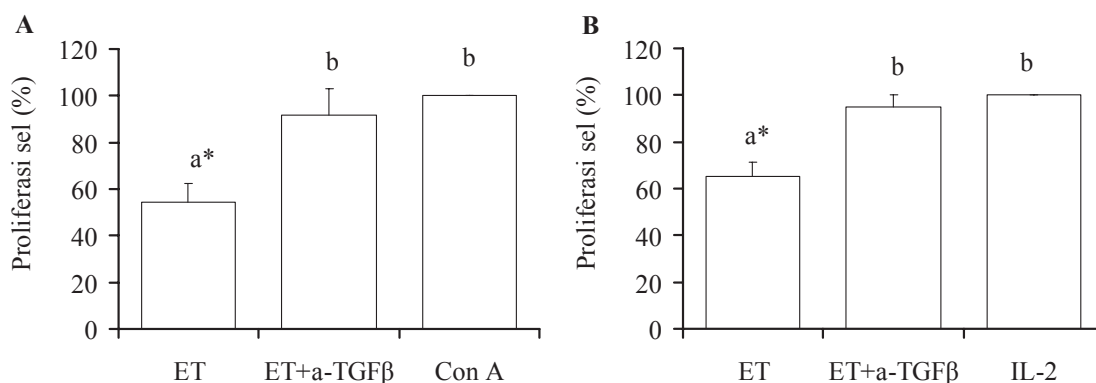


Gambar 2. Hasil analisis *western blot* TGF-β1 (25 kDa) pada ekstrak testis sapi bali (tanda panah, B). Marker bobot molekul protein (M) dan hasil elektroforesis ET pada 12,5% SDS- PAGE (A).

sel-sel limfosit secara *in vitro* oleh ET sapi bali dilakukan oleh TGF-β1. Hasil penelitian serupa tentang peran TGF-β1 testis sapi secara imunologis sangat terbatas, akan tetapi penelitian pada spesies lain mendukung temuan ini, yaitu bahwa TGF-β1 berperan pada penghambatan proliferasi sel-sel T dan produksi IL-2 (McKarns & Schwartz, 2005; Cheng *et al.*, 2006; Das & Levine, 2008). Lebih lanjut, penelitian pada rusa menunjukkan bahwa TGF-β1 dan TGF-β3 testiskuler berhubungan dengan aktivitas spermatogenik (Wagener *et al.* 2005).

Berdasarkan data tersebut, menarik untuk dikaji peran TGF-β1 secara *in vivo* pada testis sapi bali. Menurut Robertson *et al.* (2002), pemaparan TGF-β1 seminal plasma hewan jantan pada proses pembuahan meningkatkan keberhasilan kebuntingan melalui proses imun toleran induk betina terhadap janin. Sejalan dengan ini, King *et al.* (2000) melaporkan bahwa TGF-β berpengaruh positif dalam memacu perkembangan embrio sapi secara *in vitro*. Hal ini dapat dipahami ketika proses pembuahan dilihat sebagai suatu proses masuknya benda asing ke dalam tubuh induk betina (maternal). Ketika semen dan sperma diintrodusir ke tubuh maternal, sistem imun maternal menjadi aktif. Keberadaan TGF-β1 pada seminal plasma paternal, TGF-β1 ini menekan aktivitas dan proliferasi sel-sel imun termasuk sel-sel T sehingga reaksi penolakan

untuk memastikan apakah TGF-β1 berperan aktif pada proses penghambatan proliferasi limfosit mencit, dilakukan uji anulir efek TGF-β1, dengan menambahkan anti-TGF-β1 pada sel limfosit yang dikultur dengan ET, yang distimulasi Con A maupun IL-2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa anti-TGF-β1 dapat menganulir pengaruh ET sapi bali terhadap penghambatan proliferasi sel-sel limfosit (Gambar 3). Berdasarkan hal tersebut dapat dikatakan bahwa penghambatan proliferasi



Gambar 3. Penghambatan proliferasi limfosit mencit Balb/c oleh ekstrak testis sapi bali (ET) dapat dianulir oleh *anti* TGF-β1 *antibody* (ET+a- TGF-β1) baik saat dikultur dengan Con A (A) maupun IL-2 (B). Superskrip berbeda menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$); * berbeda nyata ($P < 0,01$) terhadap kontrol (Con A atau IL-2); n=4.

terhadap semen dan juga janin tidak terjadi (Tremellen & Robertson, 1997; Robertson & Sharkey, 2001).

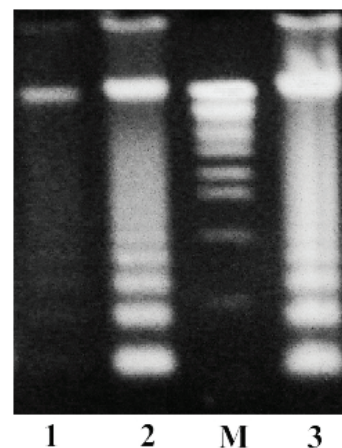
Jika hipotesa tersebut berlaku pada testis sapi bali, maka dari hasil penelitian ini dapat dipostulatkan bahwa salah satu sifat prolifrik dari sapi bali dibanding sapi lainnya seperti brahman, dari segi imunologi reproduksi, kemungkinan salah satunya adalah andil dari TGF- β 1 (King *et al.*, 2000; Robertson *et al.*, 2002; Hedger & Meinhardt, 2003; Itman *et al.*, 2006; Drummond & Findlay, 2006). Namun demikian khusus pada sapi bali hal ini masih perlu dibuktikan lebih lanjut melalui penelitian yang lebih intensif.

Mekanisme penghambatan proliferasi sel-sel limfosit secara alami dapat terjadi melalui kematian ataupun kematian yang terprogram (apoptosis) demi mempertahankan homeostasis tubuh. Apoptosis memiliki ciri khas yakni terjadinya kondensasi sitoplasmik, letupan membran plasma dan *nuclear pycnosis* yang mengakibatkan terurainya DNA inti sel menjadi fragmen-fragmen oligonukleosoma. Deteksi terhadap kultur sel yang mengalami apoptosis antara lain dengan cara ekstraksi DNA inti sel dan mengkarakterisasi fragmen oligonukleosoma yang terbentuk menggunakan *agarose gel electrophoresis* yang secara visual tampak berupa *ladder* (Ioannou & Chen, 1996).

Hipotesa yang diajukan mengenai mekanisme penghambatan proliferasi sel-sel imun oleh immunosupresan isolat ekstrak testis juga masih sangat bervariasi. Namun sebagian besar peneliti melaporkan bahwa penghambatan dilakukan melalui mekanisme penghambatan proliferasi sel-sel imun, khususnya sel-sel T, melalui proses apoptosis (Bellgrau *et al.*, 1995). Apoptosis merupakan kematian sel secara fisiologis (terprogram) untuk menjaga homeostasis tubuh (Takahashi *et al.*, 1994). Hal yang menarik dari modus reduksi sel-sel T yang dikultur bersamaan dengan bahan bioaktif immunosupresan testis adalah adanya fenomena apoptosis tersebut (Bellgrau *et al.*, 1995; Depamede, 2006). Ini menunjukkan bahwa kehadiran immunosupresan di dalam

testis memiliki fungsi fisiologis yang belum diungkapkan.

Beberapa laporan terdahulu menunjukkan bahwa penghambatan proliferasi sel-sel imun terjadi antara lain melalui proses apoptosis (Krammer *et al.*, 1994; Bellgrau *et al.*, 1995). Proses penghambatan proliferasi sel-sel limfosit mencit Balb/c oleh ET sapi bali pada penelitian ini terjadi melalui proses apoptosis (Gambar 4). Berdasarkan pemahaman ini dapat diajukan pemikiran bahwa kehadiran TGF- β 1 pada testis sapi bali memiliki peran krusial khususnya dalam hal menunjang fungsi testis sebagai produsen sperma. Spermatozoa dilaporkan memiliki potensi imunogenik yang dapat menimbulkan respon autoimun. Spermatozoa perlu dilindungi sedemikian rupa secara anatomis, melalui adanya *blood testis barrier*, maupun fisiologis, melalui ketersediaan *milleau immunosupresan*, di dalam testis untuk melindunginya dari serangan sel imun diri sendiri. *Milleau immunosupresan* ini antara lain TGF- β (Pollanen *et al.*, 1993; O'Leary *et al.*, 2002), *activin* dan *fas ligan* yang bekerja menghambat proliferasi sel-sel



Gambar 4. Elektroforesis fragmentasi DNA limfosit mencit Balb/c yang dikultur tanpa ekstrak testis (ET) sapi bali (1), atau dengan ET dan Con A (2), atau dengan ET dan IL-2 (3). Perlakuan dengan ET (2) dan (3) menghasilkan pola *classic ladder* sebagai indikasi terjadinya apoptosis pada limfosit mencit Balb/c. Marker DNA lambda (M).

limfosit T melalui proses apoptosis (Bellgrau *et al.*, 1995).

KESIMPULAN

Penghambatan proliferasi limfosit menciit Balb/c oleh ekstrak testis sapi bali secara *in vitro* dilakukan oleh TGF- β 1. Mekanisme penghambatan ini terjadi melalui proses apoptosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Dirjen Dikti (DP2M), Depdiknas RI melalui Hibah Penelitian Fundamental No. 046/SP2H/PP/DP2M/III/2007 dan No. 028/SP2H/PP/DP2M/III/2008. Ucapan terima kasih disampaikan kepada teknisi Laboratorium Immunobiologi (IGA Sri Andayani, Khalid dan Suparman), dan teknisi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Fakultas Peternakan Unram (Dedy) yang telah membantu secara teknis pengerjaan di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Adolfsson, O., B.T. Huber & S.N. Meydani.** 2001. Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. *J. Immunology* 167: 3809–3817.
- Bellgrau, D., D. Gold, H. Selawry, J. Moore, A. Franuzusoff & R.C. Duke.** 1995. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377: 630-632.
- Cheng, M-L., H-W. Chen, J-P. Tsai, Y-C. Shih, C-M. Chang & C-C. Ting.** 2006. Clonal restriction of the expansion of antigenic-specific CD8⁺ memory T cells by transforming growth factor β . *J. Leukoc. Biol.* 79: 1033-1042.
- Das, L. & A.D. Levine.** 2008. TGF- β inhibits IL-2 production and promotes cell cycle arrest in TCR-activated effector/memory T Cells in the presence of sustained TCR signal transduction. *J. Immunology* 180: 1490–1498.
- Depamede, S.N.** 2004. Recombinant expression and comparative characterisation of *Plasmodium falciparum* aspartate transcarbamoylase. Master thesis, Flinders University, Adelaide.
- Depamede, S.N.** 2006. Isolation and characterisation of the immunosuppressive peptides in the rat testis. PhD thesis, University of Adelaide.
- Depamede, S. N. & A. Rosyidi.** 2007. *In vivo* and *in vitro* immunosuppressive activity of Bali cattle extract testis on Balb/c lymphocytes. Poster PS 33. International Conference On Molecular Biology of Life Sciences. Brawijaya University, Malang, Indonesia.
- Drummond, A. & J. Findlay.** 2006. Focus on TGF- β signalling (Editorial). *Reprod.* 132: 177-178.
- Dufour, J.M., R.V. Rajotte, K. Seeberger, T. Kin, & G.S. Korbitt.** 2003. Long-term survival of neonatal porcine Sertoli cells in non-immunosuppressed rats. *Xenotransplant.* 10: 577-586.
- Emoto, M., E. Kita, F. Nishikawa, N. Katsui, Y. Yagy & S. Kashiba.** 1990. Biological functions of mouse seminal vesicle fluid I. Suppression of blastogenic responses of lymphocytes. *Arch. Androl.* 24: 35-40.
- Foulds, L.M., R.I. Boysen, M. Crane, Y. Yang, J. A. Muir, A.I. Smith, D.M. de Kretser, M. T.W. Hearn & M.P. Hedger.** 2008. Molecular identification of lyso-glycerophosphocholines as endogenous immunosuppressives in bovine and rat gonadal fluids. *Biol. Reprod.* 79: 525-536.
- Haagmans B.L., J.W. Hoogerbrugge, A.P. Themmen, & K.J. Teerds.** 2003. Rat testicular germ cells and Sertoli cells release different types of bioactive transforming growth factor beta *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1: 3.
- Handiwirawan, E. & Subandriyo.** 2004. Potensi dan keragaman sumberdaya genetik sapi Bali. *Wartazoa* 14: 107-115.
- Hedger, M. P., J-X. Qin, D.M. Robertson, & D.M. de Kretser.** 1990. Intra-gonadal of immune system functions. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 263-280.
- Hedger, M.P., J. Wang, H.Y. Lan, R.C. Atkins, & N.G. Wreford.** 1998. Immunoregulatory activity in adult rat testicular interstitial fluid: relationship with intratesticular CD8⁺ lymphocytes following treatment with ethane dimethane sulfonate and testosterone implants. *Biol.Reprod.* 58: 935-942.
- Hedger, M.P. & A. Meinhardt.** 2003. Cytokines and the immune-testicular axis. *J.Reprod. Immunol.* 58: 1-26.
- Hedger, M.P., J. Klug, S. Frohlich, R. Muller, & A. Meinhardt.** 2005. Regulatory cytokine expression and interstitial fluid formation in

- the normal and inflamed rat testis are under leydig cell control. *J. Androl.* 26:379–386.
- Ioannou, Y.A. & F.W. Chen.** 1996. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Research* 24: 992-994.
- Itman, C., S. Mendis, B. Barakat, & K.L. Loveland.** 2006. All in the family: TGF- β family action in testis development. *Reprod.* 132: 233-246.
- Kaps, M. & W.R. Lamberson.** 2004. *Biostatistics for Animal Science.* CABI Publishing, Wallingford, U.K.
- King, A.L., R.D. Fung, D.B. Smith, L.A. Imwalle, L.A. Anderson & K.K. Schillo.** 2000. Effects of transforming growth factor β (TGF) on development of embryos *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 78(Suppl. 1).
- Kingsley, D.M.** 1994. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev.* 8:133–146
- Konrad, L, M. Albrecht, H. Renneberg & G. Aumuller.** 2000. Transforming growth factor-beta2 mediates mesenchymal-epithelial interactions of testicular somatic cells. *Endocrinol.* 141: 3679–3686.
- Krammer, P.H., I. Behrman, P. Daniel, J. Dhein & K.-M. Debatin.** 1994. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 279.
- McKarns, S.C. & R.H. Schawrtz.** 2005. Distinct effects of TGF- β 1 on CD4⁺ and CD8⁺ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J. Immunol.* 174: 2071-2083.
- Maddocks, S. & B.P. Setchell.** 1990. Recent evidence for immune privilege in the testis. *J. Reprod. Immunol.* 18: 9-18.
- Mossmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55-63.
- O'Leary, S., S.A. Robertson & D.T. Armstrong.** 2002. The influence of seminal plasma on ovarian function in pigs—a novel inflammatory mechanism? *J. Reprod. Immunol.* 57: 225–238.
- Pollanen, P., O. Soder & J. Uksila.** 1988. Testicular immunosuppressive protein. *J. Reprod. Immunol.* 14: 125-138.
- Pollanen, P., O. Soder, S. Sainio-Pollanen, P. Zalewski, I. Forbes, J. Uksila & B.P. Setchell.** 1989. Testicular immunosuppressive. *Proc. IVth Int. Cong. Androl.* Monduzi Editore, Bologna. Pp. 177-182.
- Pollanen, P., M. von Euler, K. Jahnukainen, T. Saari, M. Parvinen, S.Sainio-Pollanen & O. Soder.** 1993. Role of transforming growth factor β in testicular immunosuppression. *J. Reprod. Immunol.* 24: 123-137.
- Robertson, S.A. & D.J. Sharkey.** 2001. The role of semen in induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Semin. Immunol.* 13, 243–254.
- Robertson, S.A., W.V. Ingman, S. O'Leary, D.J. Sharkey & K.P. Tremellen.** 2002. Transforming growth factor β - a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.* 57: 109-128.
- Sanberg, P.R., C.V. Borlongan, S. Saporta & D.F. Cameron.** 1996. Testis-derived Sertoli cells survive and provide localized immunoprotection for xenografts in rat brain. *Nature Biotech.* 14: 1692-1695.
- Spee, B., L.C. Penning, T.S.G.A.M. van den Ingh, B. Arends, J. IJzer, F.J. van Sluijs & J. Rothuizen.** 2005. Regenerative and fibrotic pathways in canine hepatic portosystemic shunt and portal vein hypoplasia, new models for clinical hepatocyte growth factor treatment. *Comparative Hepatology* 4: 7.
- Streilein, J.W.** 1995. Unraveling immune privilege. *Science* 270: 1158.
- Takahashi, T., M. Tanaka, J. Inazawa, T. Abe, T. Suda & S. Nagata.** 1994. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int. Immun.* 6: 1567-1574.
- Tremellen, K.P. & S.A. Robertson.** 1997. Potential role of seminal plasma TGF-beta in the initiation of the post-coital inflammatory response in humans. *J. Reprod. Immunol.* 34:76.
- Veselsky, L., V. Holand, A. Zajicova, J. Dostal & B. Zelezna.** 2003. Effects of boar seminal immunosuppressive fraction on production of cytokines by concanavalin A-stimulated spleen cells and on proliferation of B lymphoma cell lines. *AJRI* 49: 249-254.
- Wagener A., J. Fickell, J. Schön, A. Fritzenkötter, F. Göritz & S. Blottner.** 2005. Seasonal variation in expression and localization of testicular transforming growth factors TGF- β 1 and TGF- β 3 corresponds with spermatogenic activity in roe deer. *J. Endocrin.* 187: 205-215.
- Xu, J., A.R., Beyer, W.H. Walket & E.A. McGee.** 2003. Developmental and stage-specific expression of Smad2 and Smad3 in rat testis. *J. Androl.* 24: 192–200.