

9

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN

SELESAI

- 1 MAY 2004



LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2002

**IDENTIFIKASI RESEPTOR FERTILISASI PADA HOMOGENAT  
MEMBRAN PLASMA SPERMATOZOA KAMBING SEBAGAI  
BAHAN UJI ANTIFERTILITAS**

Peneliti:

**Drh. TJUK IMAM RESTIADI, M.Si.**

**Drh. IMAM MUSTOFA, M.Kes.**

**Drh. SUWARNO, Msi.**

**Drh. SRI MULYATI, M.Kes.**

13/04  
12  
SP

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2002

S.K Rektor Universitas Airlangga Nomor 4879/J03/PG/2001

Tanggal 7 Juni 2002

Nomor Urut: 13

FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA

Nopember, 2002



## RINGKASAN

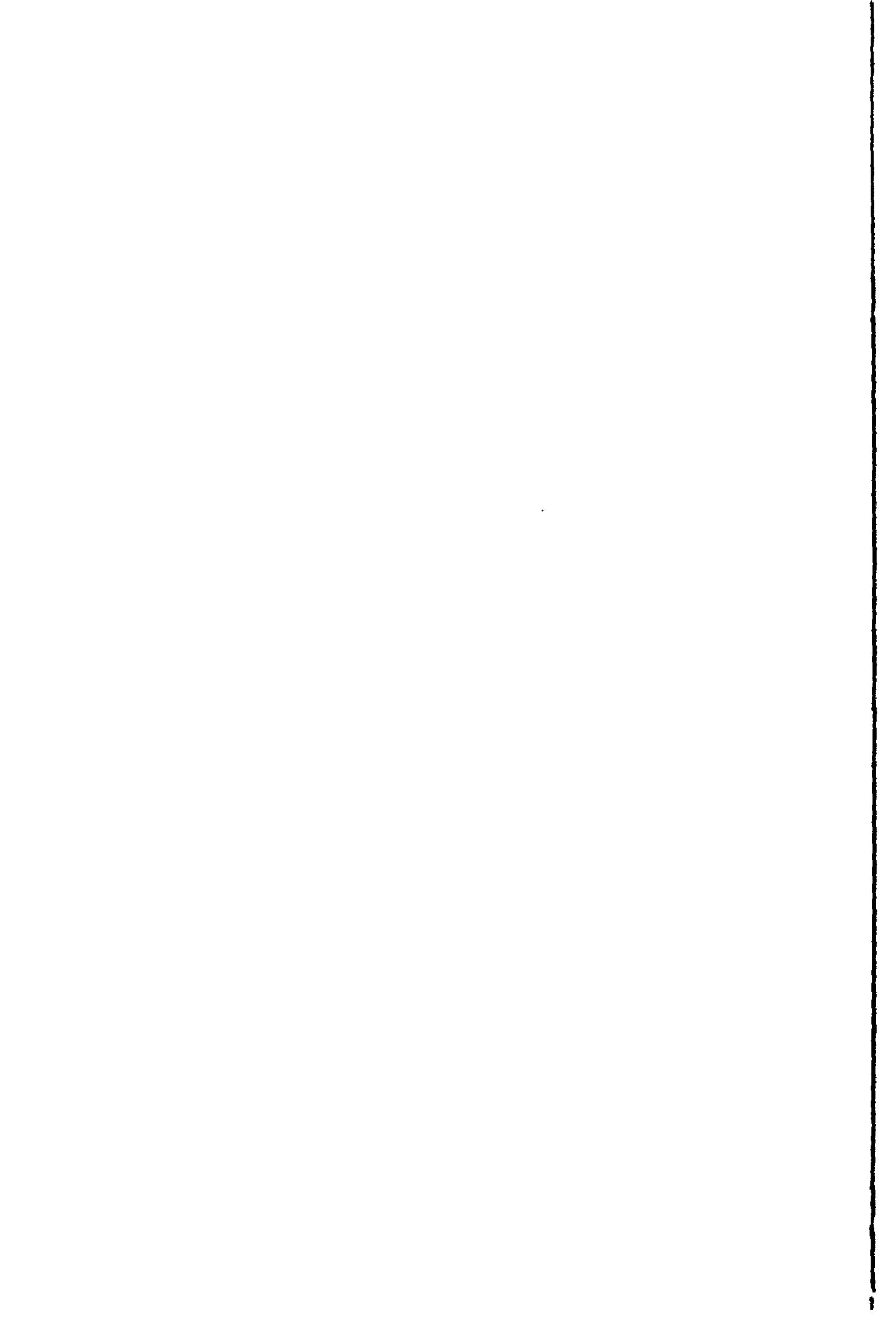
Judul Penelitian : Identifikasi Reseptor Fertilisasi Pada Homogenat Membran Plasma Spermatozoa Kambing Sebagai Bahan Uji Antifertilitas  
Ketua Peneliti : Tjuk Imam Restiadi, M.Si., drh.  
Anggota Peneliti : Imam Mustofa, M.Kes., drh.  
Suwarno, M.Si., drh.  
Sri Mulyati, M.Kes., drh.  
Bulan, Tahun : Januari 2003.

Akhir-akhir ini penelitian-penelitian diarahkan pada usaha untuk menemukan kontrasepsi secara imunologis dengan memanfaatkan potensi protein antigenik gamet. Dengan metode immunokontrasepsi diharapkan fertilisasi dapat dicegah tanpa mengganggu fungsi fisiologis hormonal pada sistem reproduksi. Penelitian yang telah banyak dilakukan adalah pada ZP3 babi dan sapi, yang pada masyarakat tertentu (Islam dan Hindu) dapat menimbulkan masalah sosial tersendiri. Selain itu penelitian-penelitian tersebut sampai saat ini juga belum memberikan hasil yang memuaskan, karena masih ditemukannya efek samping selama masa pengujian.

Tujuan Penelitian adalah : mengetahui kemampuan uji imunofluoresen natif untuk identifikasi pengenalan homogenat membran plasma spermatozoa kambing terhadap zona pelusida kambing, dan menguji kemampuan identifikasi pengenalan homogenat membran plasma spermatozoa sapi pada homogenat zona pelusida kambing.

Manfaat Penelitian : hasil positif dari penelitian ini selanjutnya dapat dipakai sebagai dasar bagi pengujian ZP3 kambing sebagai bahan vaksin kontrasepsi di masa depan yang diharapkan tidak menimbulkan efek samping pada sistem endokrin reproduksi.

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif laboratorium, tidak membutuhkan rancangan penelitian, hipotesis dan uji statistik. Bahan yang hendak diuji adalah homogenat zona pelusida, suatu matriks ekstra seluler yang diketahui mengandung reseptor fertilisasi. Reseptor tersebut dapat dikonfirmasi apabila



terbukti dalam uji imunofluoresen bahwa homogenat tersebut dapat dikenali oleh homogenat zona pelusida hewan sejenis.

Pemeriksaan mikroskopis preparat ulas spermatozoa kambing + homogenat zona pelusida kambing + antibodi I + antibodi II yang dilabel dengan *fluorescence isothiocyanate*. Gambar sel-sel spermatozoa yang berfluoresensi. Pemeriksaan mikroskopis preparat ulas spermatozoa sapi + homogenat zona pelusida kambing + antibodi I (antibodi antisperma), dan antibodi II yang dilabel dengan *fluorescence isothiocyanate* (FITC). Gambar sel spermatozoa tidak berfluoresensi.

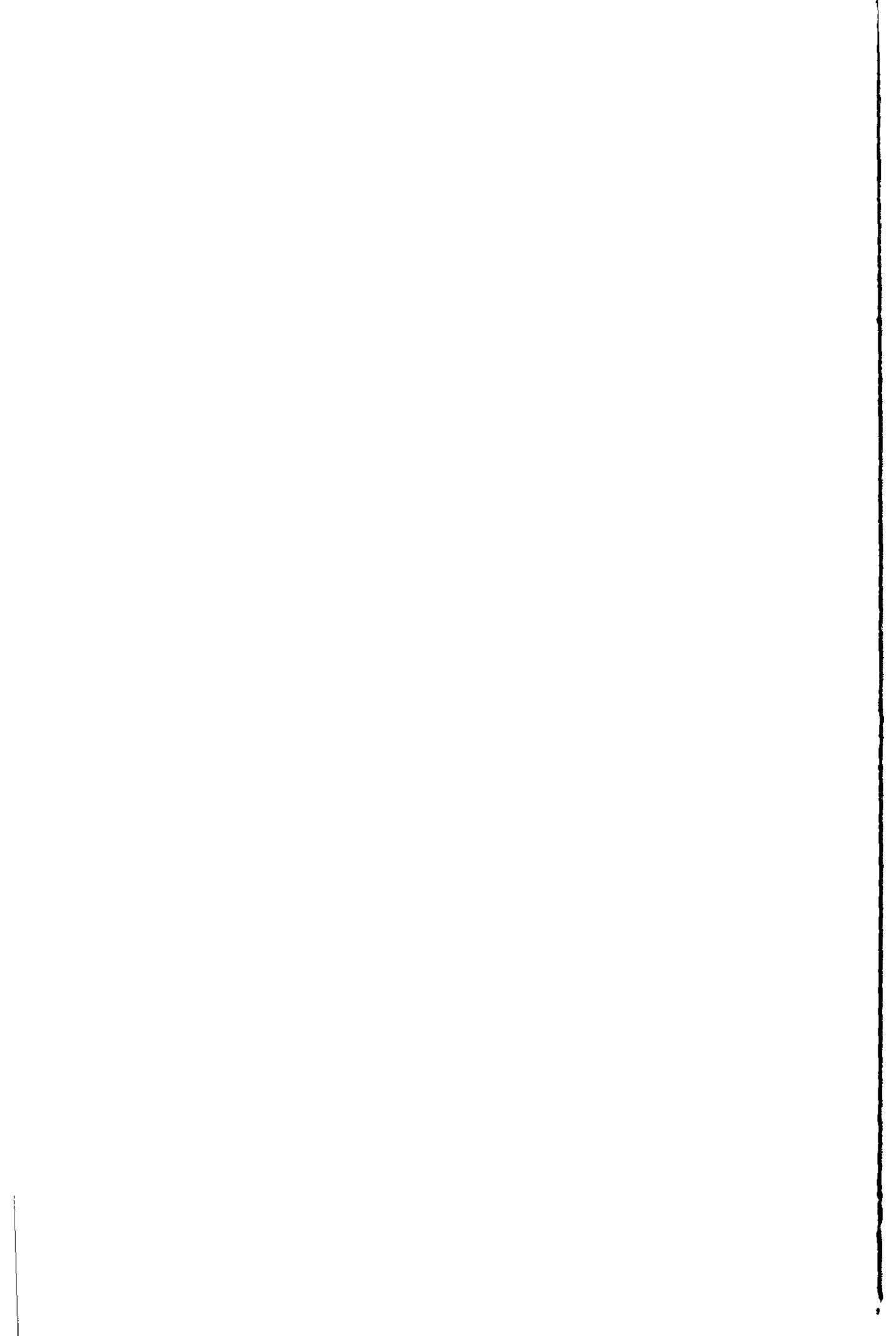
Spermatozoa kambing berikatan dengan homogenat ZP kambing (hewan sejenis), selanjutnya homogenat ZP kambing berikatan dengan antibodi I, antibodi I berikatan dengan antibodi II yang dilabel dengan dengan FITC. Pemeriksaan preparat di bawah mikroskop UV tampak sel spermatozoa memancarkan sinar fluoresensi. Membuktikan adanya reseptor fertilisasi pada homogenat ZP kambing. Spermatozoa kambing berikatan dengan homogenat ZP kambing, selanjutnya dengan antibodi I dan antibodi II dari hewan sejenis (homolog).

Penelitian Hasegawa *et al.*(2001) yaitu : spermatozoa manusia (pasien kondisi parah, penyimpanan -196 °C) ditambahkan oosit manusia (penyimpanan beku) ditambahkan antiserum pengenceran 1: 200 ditambahkan FITC terkonjugasi dengan imunoglobulin kelinci, menghasilkan intensitas fluoresensi.

Spermatozoa sapi tidak mengikat dengan homogenat ZP kambing, selanjutnya homogenat ZP kambing mengikat antibodi I dan antibodi I mengikat antibodi II yang telah dilabel FITC. Spermatozoa sapi tidak dikenali oleh homogenat ZP kambing, dan tidak membentuk ikatan.

Kesimpulan : uji imunofluoresensi natif dapat digunakan untuk mengenali spermatozoa kambing dengan homogenat zona pelusida kambing, uji imunofluoresensi natif spermatozoa sapi tidak dapat mengenali homogenat zona pelusida kambing.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga; Nomor S.K Rektor : 4874/JO3/2002; Nomor Kontrak : DIK. Suplemen Universitas Airlangga; Tahun Anggaran 2002).



## KATA PENGANTAR

Puji syukur dipanjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya, sehingga dapat menyelesaikan kegiatan penelitian berjudul : Identifikasi Reseptor Fertilisasi pada Homogenat Membran Plasma Spermatozoa Kambing sebagai Bahan Uji Antifertilitas.

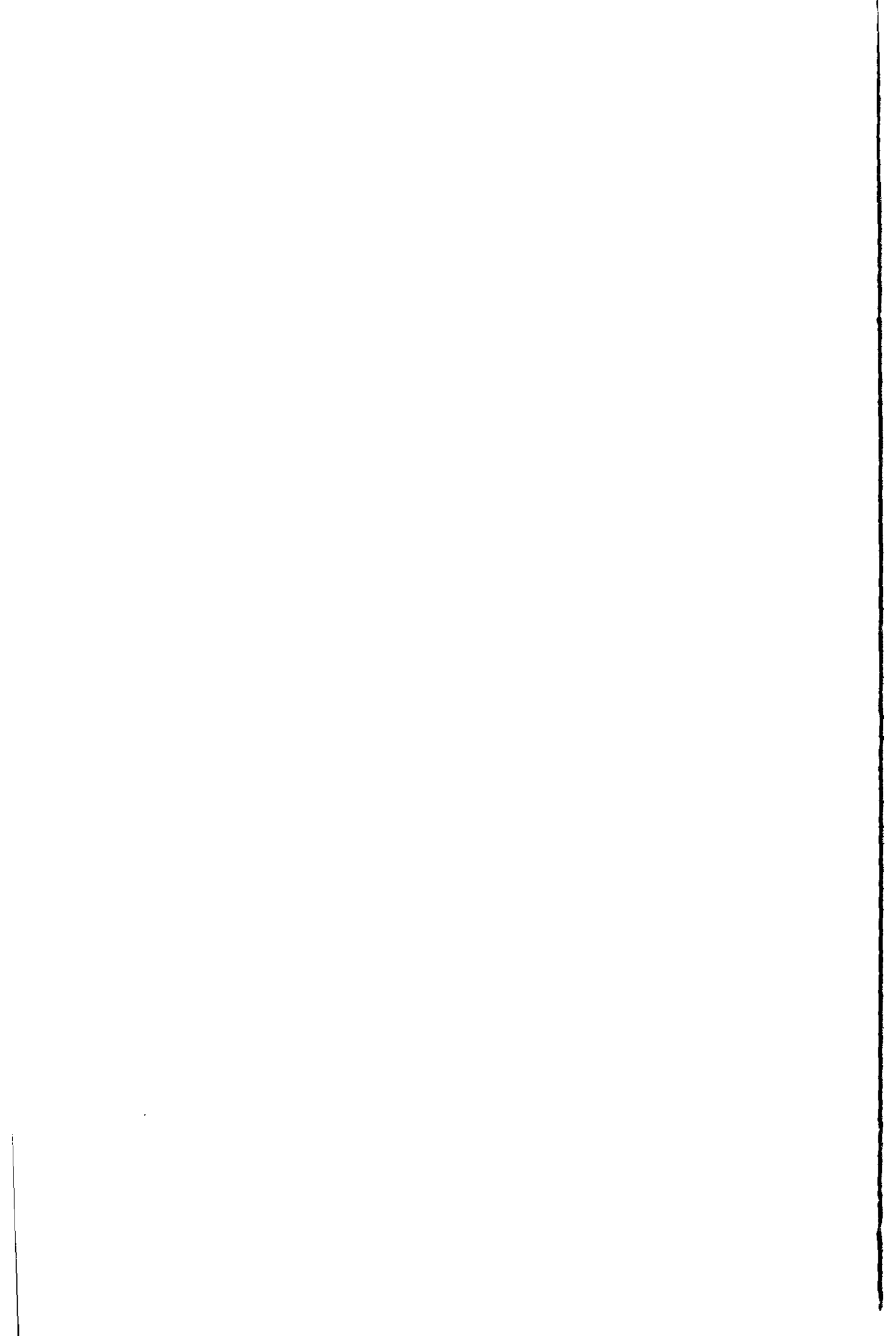
Penelitian ini dapat dilaksanakan atas pembiayaan dari dana DIK Rutin Universitas Airlangga tahun Anggaran 2002. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga atas kepercayaannya mengabulkan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan,
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga atas kelancaran administrasi mulai dari proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan hasil penelitian,
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan penelitian ini.

Akhirnya diharapkan bahwa hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk pihak-pihak yang membutuhkan pada umumnya dan bagi perkembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan khususnya.

Surabaya, Januari 2003

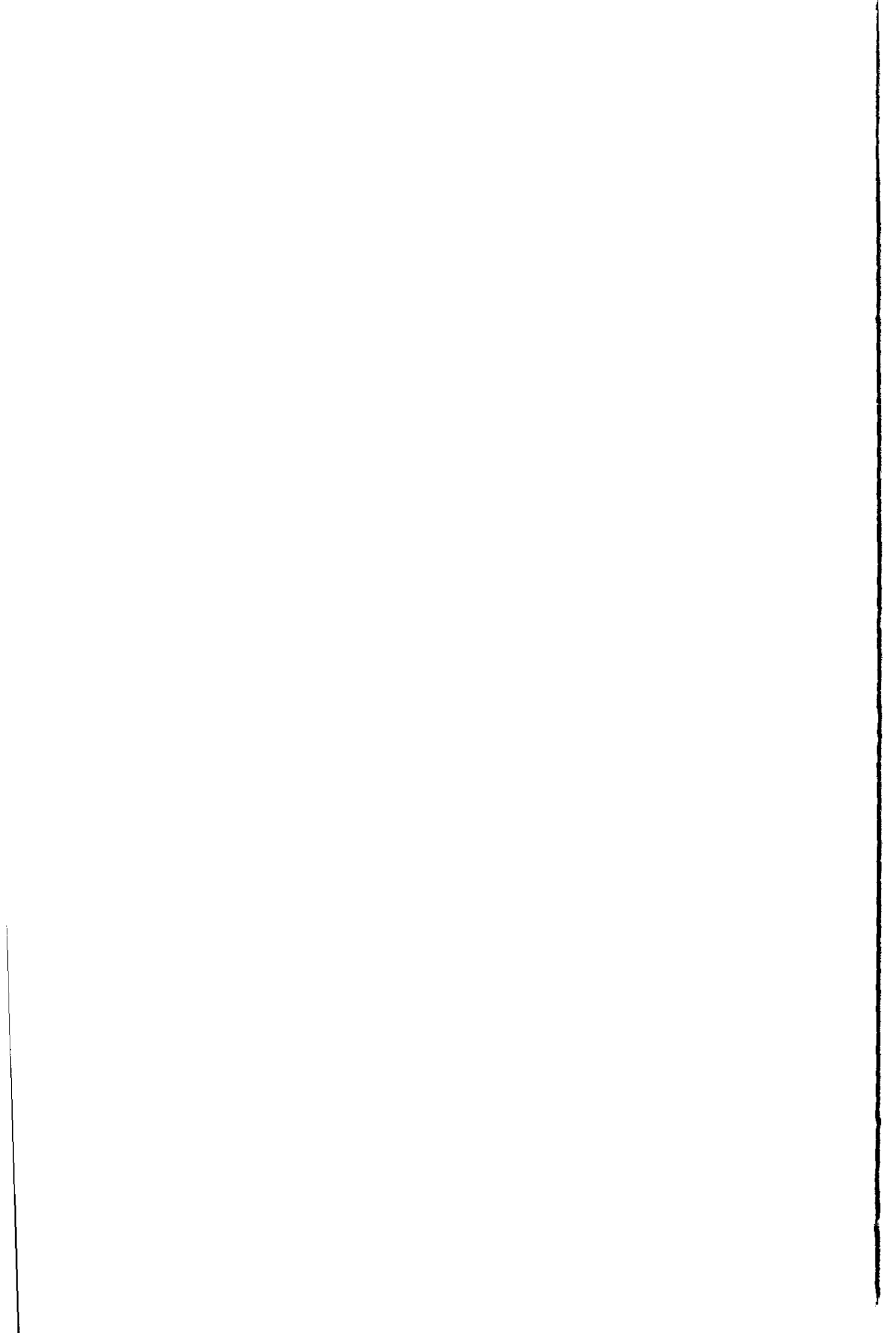
Peneliti



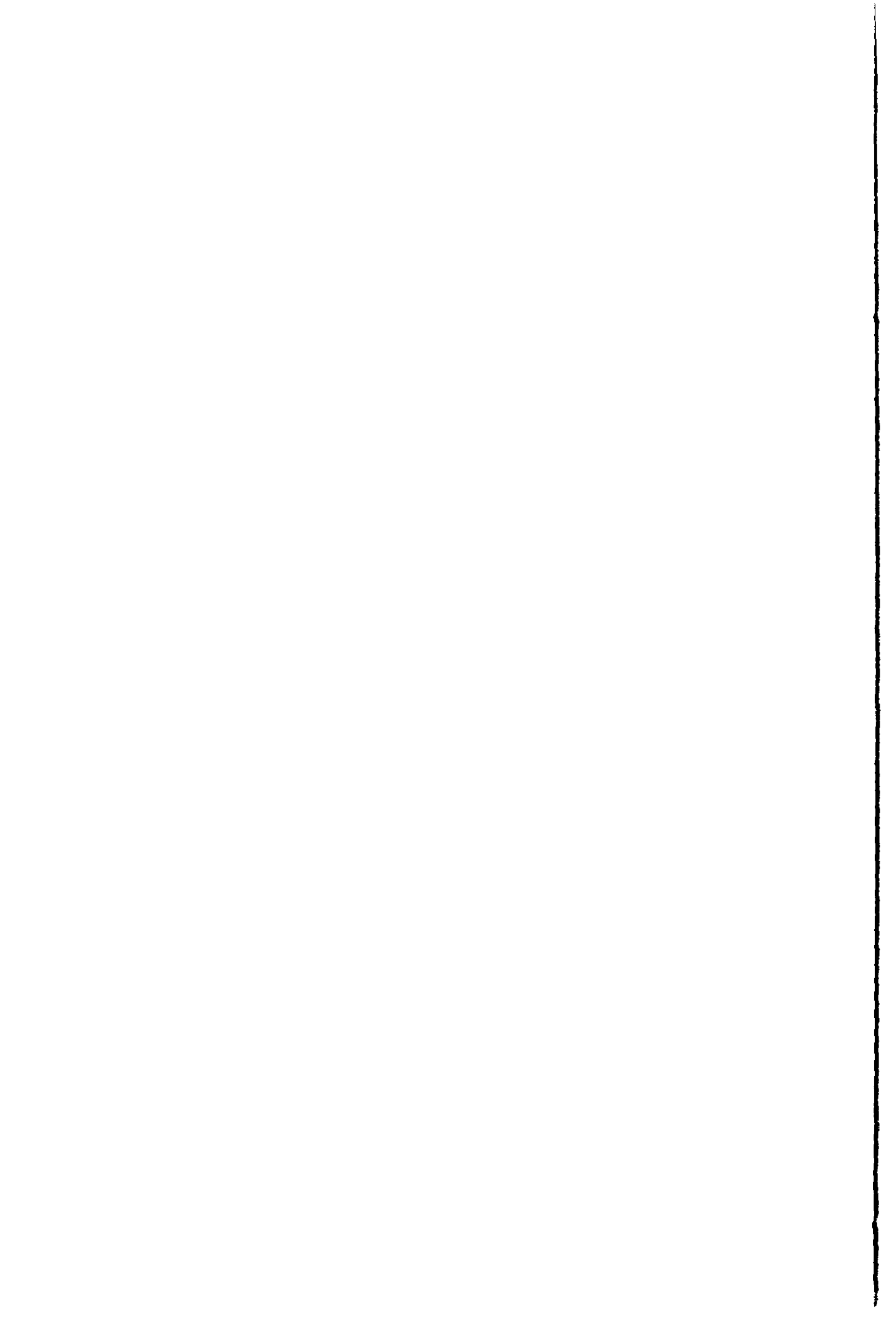


# DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	i
RINGKASAN .....	ii
KATA PENGANTAR .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
2.1. Antifertilitas .....	3
2.2. Kontrasepsi Zona Pelusida .....	4
2.3. Mekanisme Kontrasepsi Zona Pelusida .....	5
2.4. Peranan Kontrasepsi Zona Pelusida .....	6
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	9
3.1. Tujuan Penelitian .....	9
3.2. Manfaat Penelitian .....	9
BAB IV. MATERI DAN METODE PENELITIAN .....	10
4.1. Materi Penelitian .....	10
4.1.1. Bahan Penelitian .....	10
4.1.2. Peralatan Penelitian .....	11

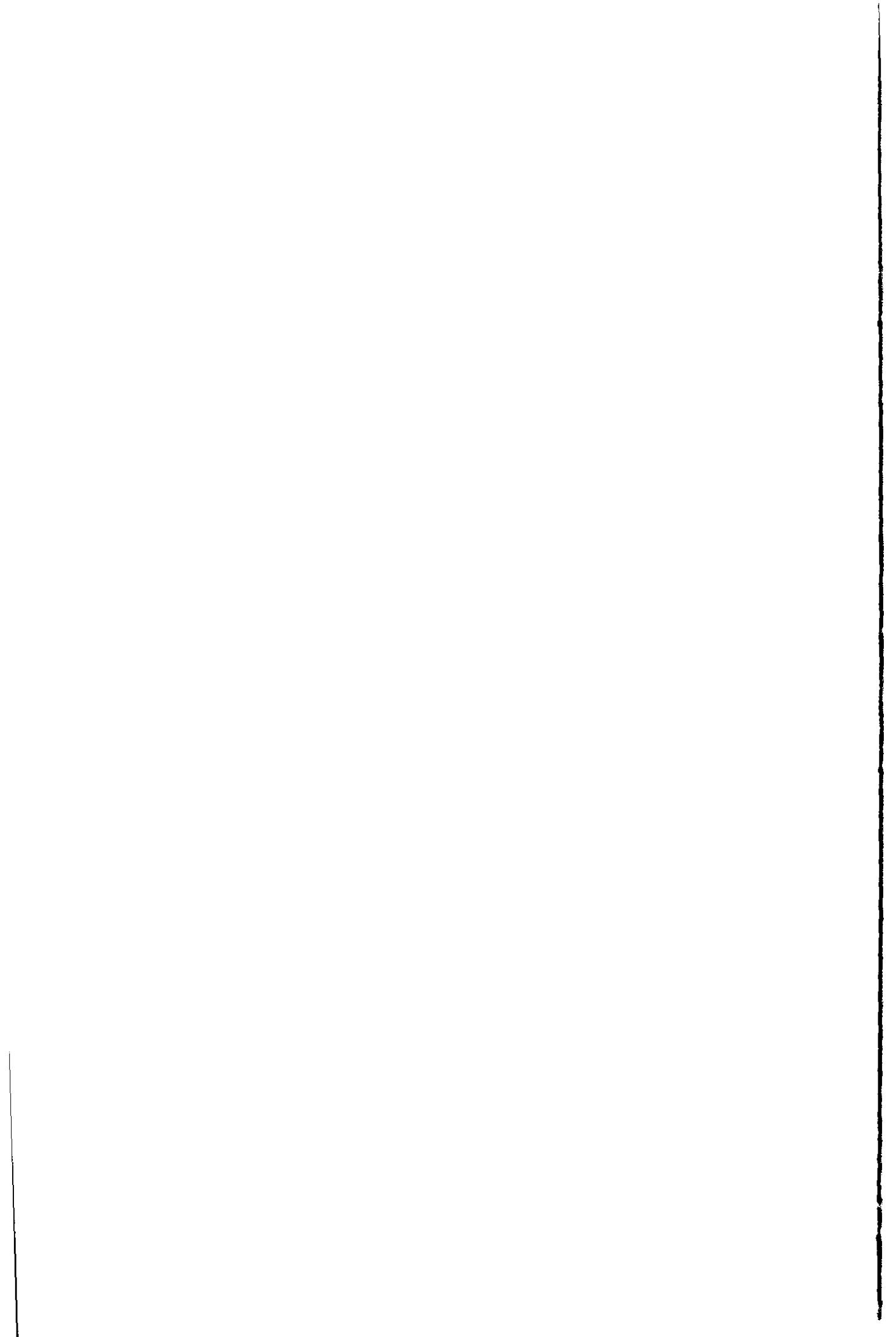


4.2. Metode Penelitian .....	11
4.2.1. Preparasi Zona Pelusida .....	11
4.2.2. Pembuatan Antibodi Anti Zona Pelusida .....	12
4.2.3. Imunofluoresen Natif .....	13
4.3. Rancangan Penelitian .....	14
BAB V. HASIL PENELITIAN .....	17
BAB VI. PEMBAHASAN .....	22
BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN .....	26
DAFTAR PUSTAKA .....	27



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Homogenat zona pelusida yang berfluoresensi (Penelitian I) .....	19
2. Spermatozoa kambing yang tidak berfluoresensi (Penelitian II) .....	19
3. Spermatozoa kambing yang berfluoresensi (Penelitian III) .....	20
4. Spermatozoa sapi yang tidak berfluoresensi (Penelitian IV) .....	20
5. Spermatozoa sapi yang tidak berfluoresensi (Penelitian V) .....	21



# BAB I

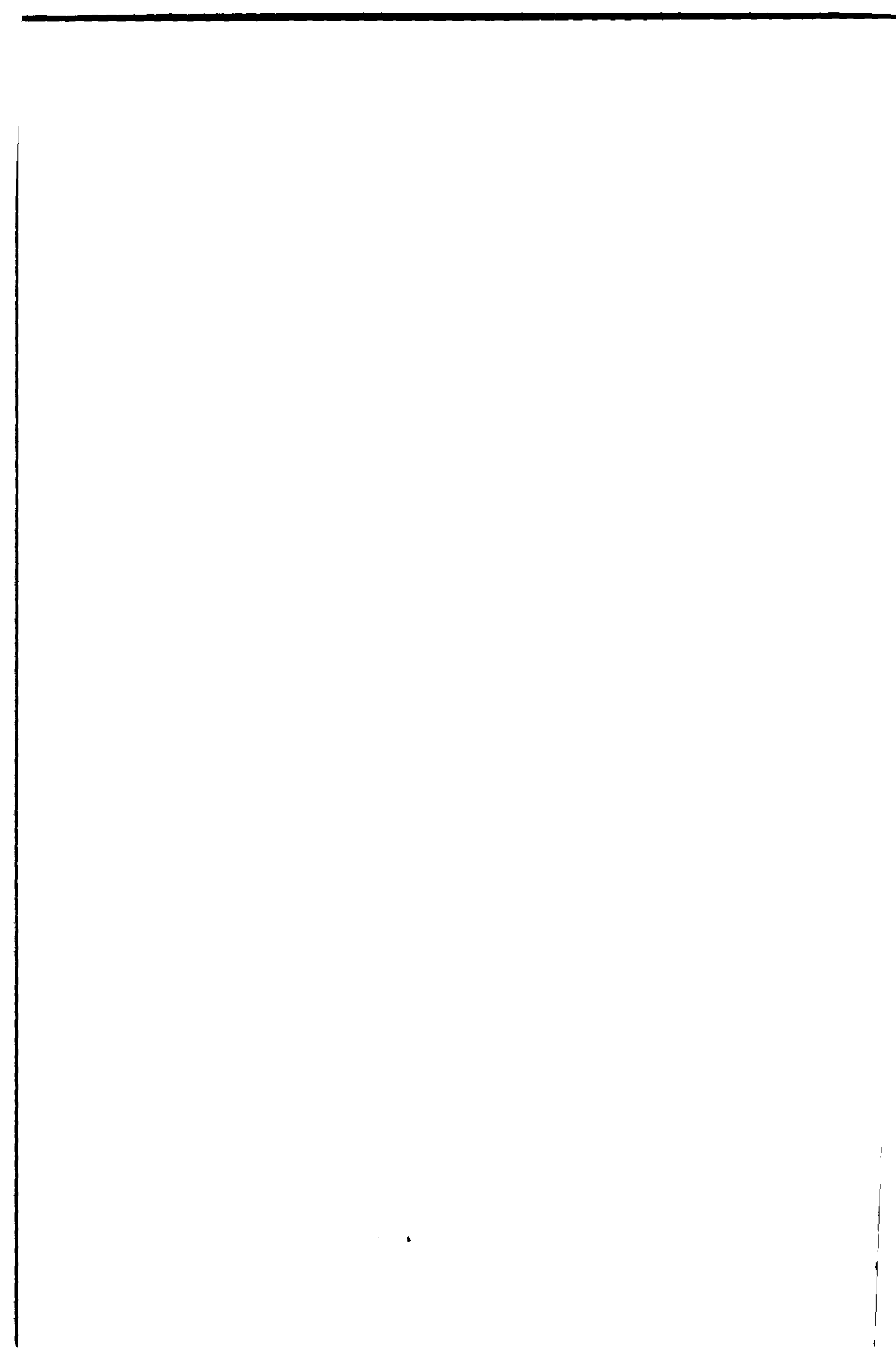
## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Penelitian

Metode kontrasepsi hormonal (pil, implant, dan suntikan depo progesteron) bersifat mengganggu fungsi fisiologis endokrin pada poros hipotalamus – hipofisis – ovarium. Keluhan yang ditimbulkan bervariasi, dapat berupa timbulnya bercak hitam di wajah (*black spot* sampai dengan *black mask*), perubahan siklus haid yang menimbulkan ketidaknyamanan dan efek kegemukan.

Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional bulan Desember 2001 melaporkan bahwa peserta Keluarga Berencana aktif yang menggunakan berbagai metode kontrasepsi adalah sebesar 67,6 % (BKKBN, 2001). Dari data tersebut berarti terdapat 32,4 % pasangan usia subur (PUS) tidak mengikuti Program Keluarga Berencana, yang berpotensi menimbulkan ledakan jumlah penduduk di masa depan. Salah satu faktor yang memungkinkan ketidakikutsertaan mereka dalam Program Keluarga Berencana tersebut diduga adalah karena ketidakcocokan metode kontrasepsi konvensional yang ada saat ini.

Akhir-akhir ini penelitian-penelitian diarahkan pada usaha untuk menemukan kontrasepsi secara imunologis dengan memanfaatkan potensi protein antigenik gamet. Dengan metode immunokontrasepsi diharapkan fertilisasi dapat dicegah tanpa mengganggu fungsi fisiologis hormonal pada sistem reproduksi. Penelitian yang telah banyak dilakukan adalah pada ZP3 babi dan sapi, yang pada masyarakat tertentu (Islam dan Hindu) dapat menimbulkan masalah sosial tersendiri. Selain itu penelitian-penelitian tersebut sampai saat ini





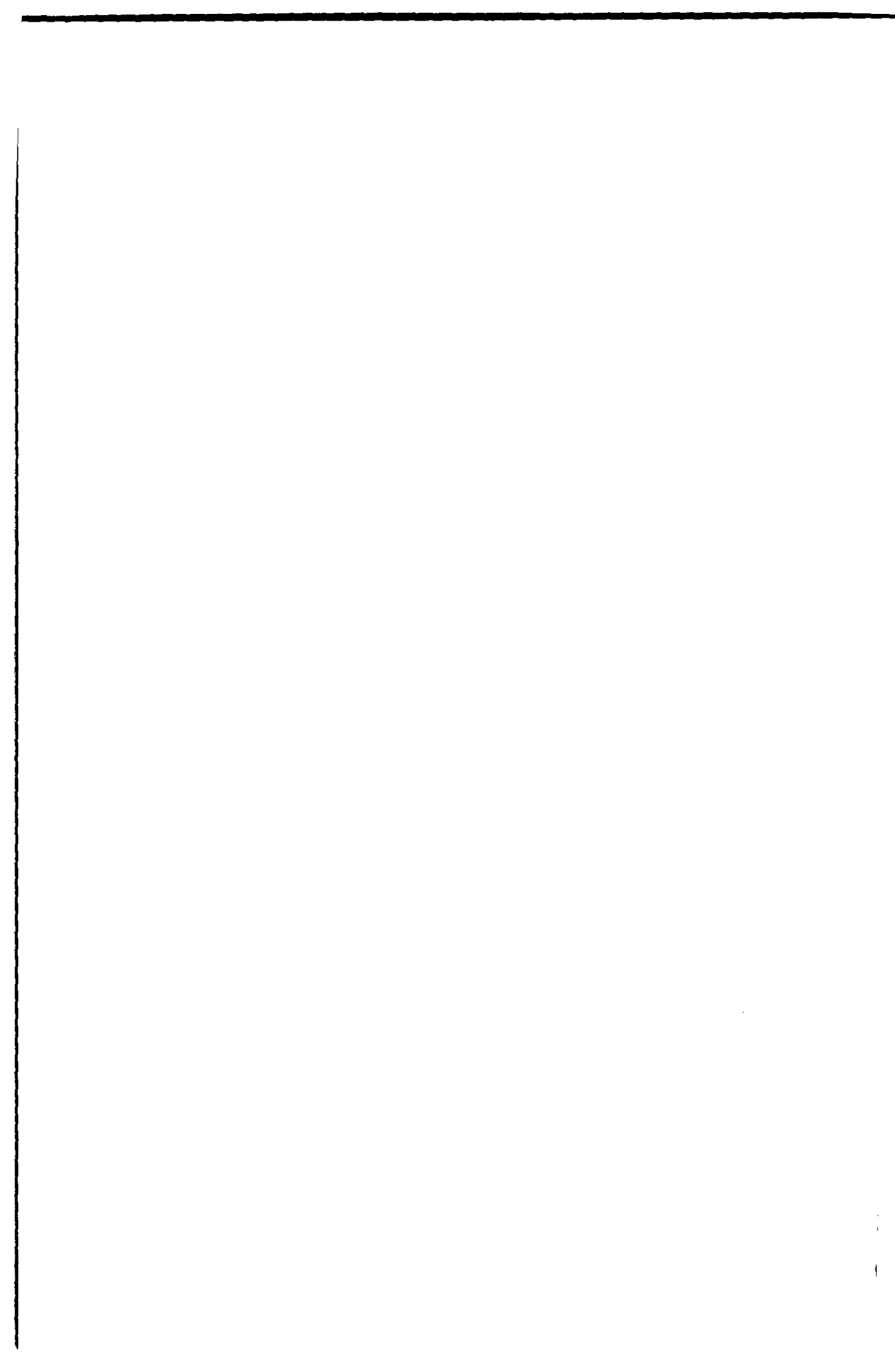
juga belum memberikan hasil yang memuaskan, karena masih ditemukannya efek samping selama masa pengujian.

Penelitian pendahuluan telah dilakukan yang menghasilkan kegagalan kebuntingan pada hewan coba (*Mus musculus*) setelah vaksinasi dengan preparat zona pelusida fraksi 3 kambing lokal (gZP3) tanpa ada efek samping pada perubahan siklus birahinya (Mulyati *et al.*, 2002).

Berdasarkan hal-hal tersebut diatas, maka direncanakan penelitian untuk mengidentifikasi reseptor fertilisasi (*egg binding protein*) pada homogenat membran plasma spermatozoa kambing untuk mengenali homogenat zona pelusida yang diketahui mengandung glikoprotein ZP3, suatu matriks ekstra seluler yang dapat dikembangkan sebagai bahan dasar vaksin kontrasepsi masa depan, sebagai alternatif baru metode kontrasepsi Program Keluarga Berencana.

## **1.2. Rumusan Masalah**

1. Apakah uji immunofluoresen natif dapat dipakai untuk mengetahui pengenalan antara homogenat zona pelusida kambing terhadap spermatozoa kambing ?
2. Apakah uji immunofluoresen natif dapat dipakai untuk mengetahui pengenalan antara homogenat zona pelusida kambing terhadap spermatozoa sapi ?



## BAB II

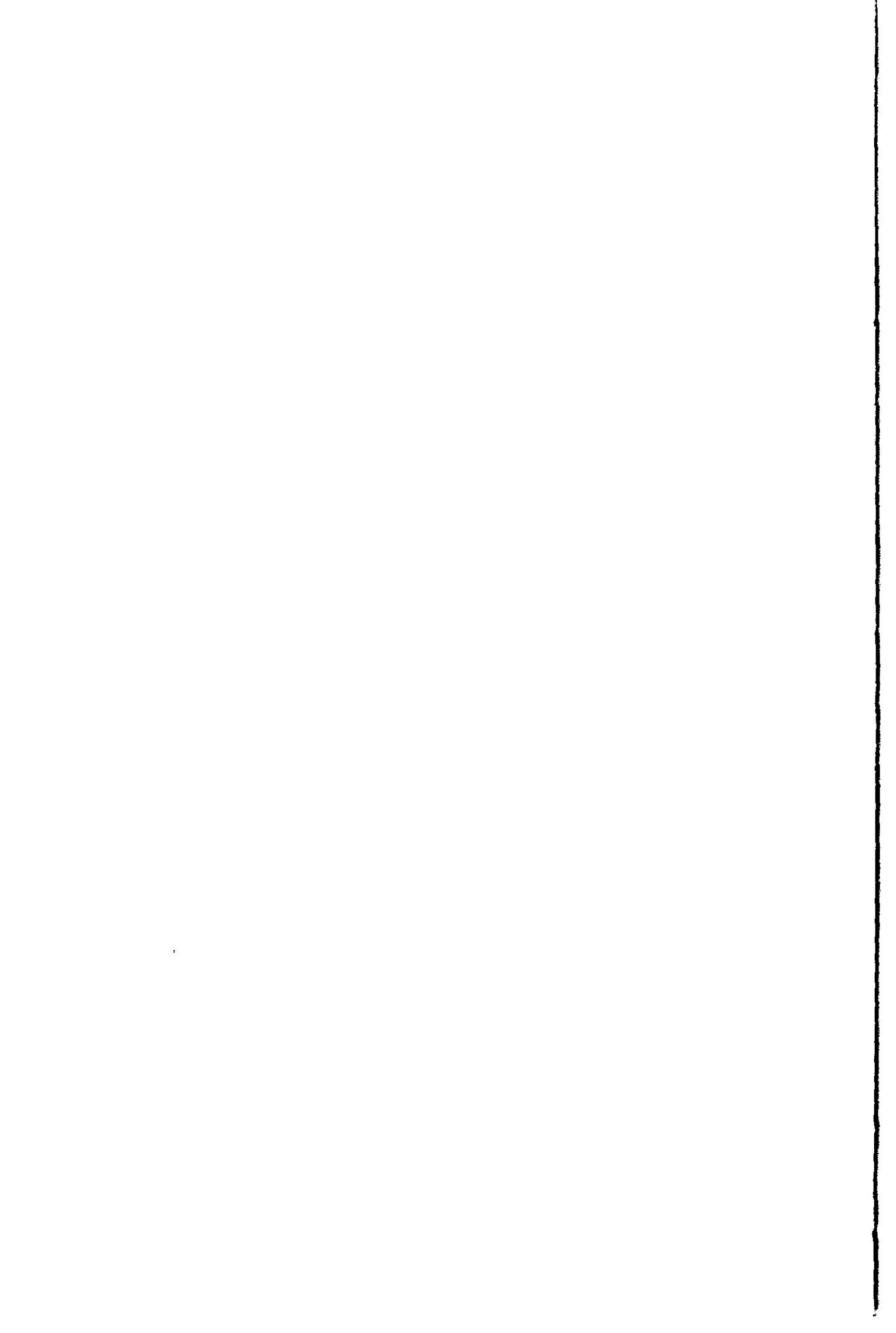
### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Antifertilitas

Antifertilitas adalah bahan yang dapat menghambat fungsi fisiologis sistem reproduksi hewan betina atau hewan jantan untuk tujuan pencegahan kebuntingan. Bahan antifertilitas yang dapat menghambat terjadinya fertilisasi disebut kontrasepsi sedangkan bahan yang bekerja setelah terjadinya fertilisasi disebut abortivum (Rahayu, 1988). Bahan yang digolongkan sebagai antifertilitas dapat bekerja pada berbagai posisi yaitu poros hipotalamus – hipofisis anterior, ovarium, tuba fallopii, uterus, vagina pada wanita dan pada pria bekerja pada proses spermatogenesis (William, 1986).

Reproduksi pada mamalia dimulai dari penyatuan sel spermatozoa dengan sel telur. Kedua gamet tersebut mengandung antigen pada permukaan selnya yang bersifat unik, *tissue spesific*, imunogenik dan dapat terikat dengan antibodi. Pengikatan antigen tersebut dengan antibodinya akan menghambat fungsi gamet dan dapat menimbulkan kegagalan fertilisasi (Naz *et al.*, 1995; Aitken *et al.*, 1996; Ndolo *et al.*, 1996), sehingga dapat dipakai sebagai bahan antifertilitas.

Antifertilitas yang bekerja pada hipotalamus – hipofisa anterior mempunyai aktifitas gonadotropin dengan mekanisme umpan balik negatif, pada hipotalamus akan menyebabkan penurunan *Gonadotropin Releasing Hormone (Gn-RH)*. Selanjutnya akan berpengaruh terhadap produksi *Follicle Stimulating Hormone (FSH)* dan *Luteinizing Hormone (LH)* pada hipofisa anterior. Adanya penurunan produksi FSH dan LH ini dapat mempengaruhi pembentukan dan

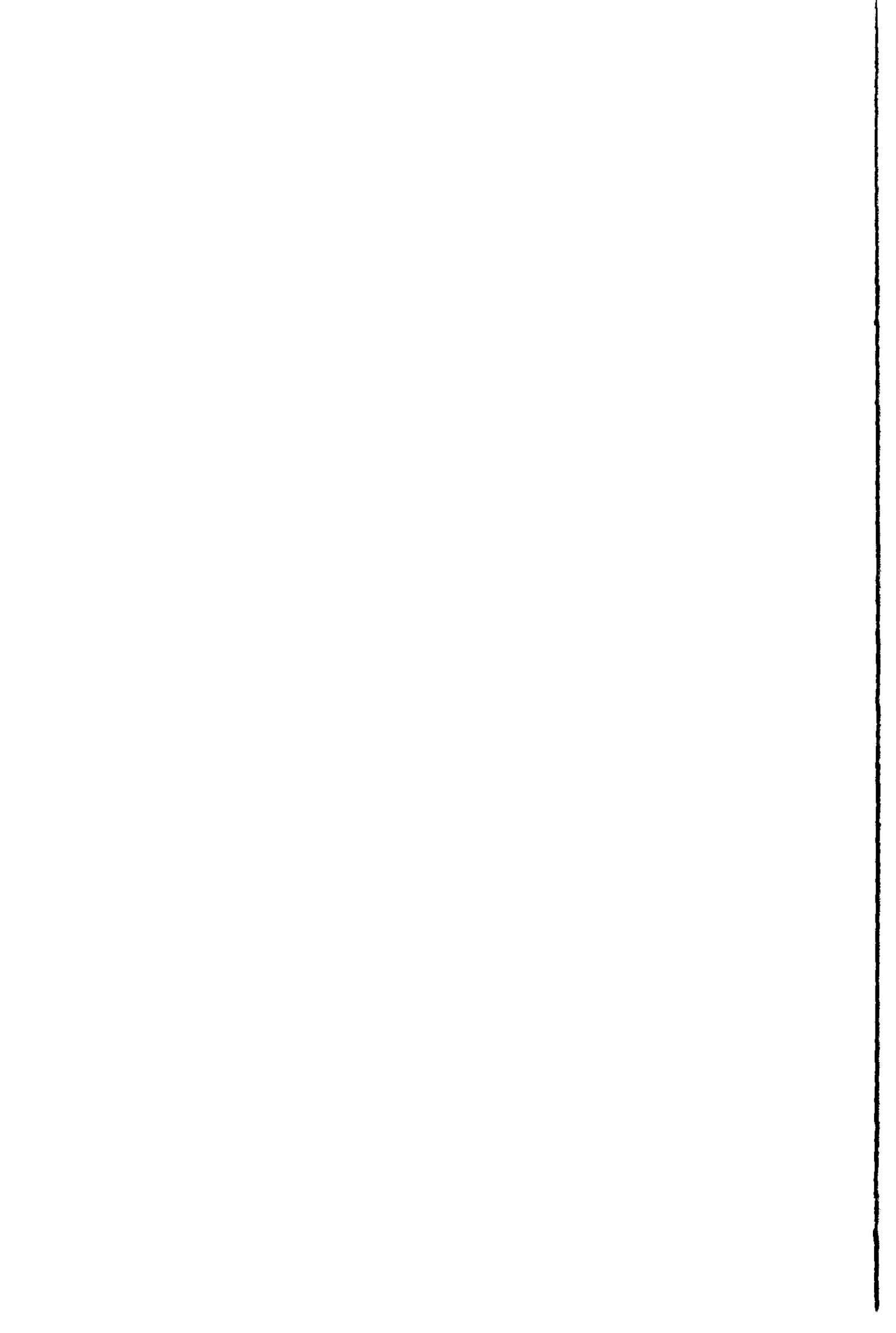


pematangan folikel serta proses ovulasi. Antifertilitas yang bekerja pada ovarium dapat mempengaruhi pembentukan folikel, perkembangan folikel dan proses ovulasi. Antifertilitas yang bekerja pada tuba fallopii akan mempengaruhi transportasi ovum maupun spermatozoa dan proses fertilisasi serta transportasi ovum atau spermatozoa dan proses fertilisasi serta transportasi zigot. Sedangkan antifertilitas yang bekerja pada uterus akan mempengaruhi proses implantasi, organogenesis serta perkembangan janin. (Lee dan Chi, 1985).

## **2.2. Kontrasepsi Zona Pelusida**

Zona pelusida merupakan lapisan ekstraseluler yang mengelilingi sel telur. Zona pelusida disintesis oleh sel telur pada saat folikulogenesis serta mempunyai fungsi penting selama fertilisasi dan masa awal periode embrionik (Yurewicz *et al.*, 1986). Zona pelusida adalah selapis sel yang terletak diluar membran vitelin yang mengelilingi oosit dan intinya. Zona pelusida bentuknya mirip gelatin dan kaya glikoprotein yang disekresikan oosit dan sel granulosa yang mempunyai vilivili kecil yang masuk ke dalam zona pelusida (Wadzicka *et al.*, 1991).

Salah satu bahan immunokontraseptif yang potensial adalah zona pelusida (ZP), yaitu suatu matriks ekstra seluler yang didapatkan dari oosit yang sedang tumbuh atau sel telur yang telah mengalami ovulasi. Hal ini disebabkan karena zona pelusida mamalia merupakan lapisan glikoprotein ekstra seluler yang memegang peranan penting untuk inisiasi interaksi antara sel spermatozoa dengan sel telur (Greenhouse *et al.*, 1999; Harris *et al.*, 1999), menghasilkan fertilisasi dan pertumbuhan pre implantasi (Gupta *et al.*, 1997; Tsubamoto *et al.*, 1999).

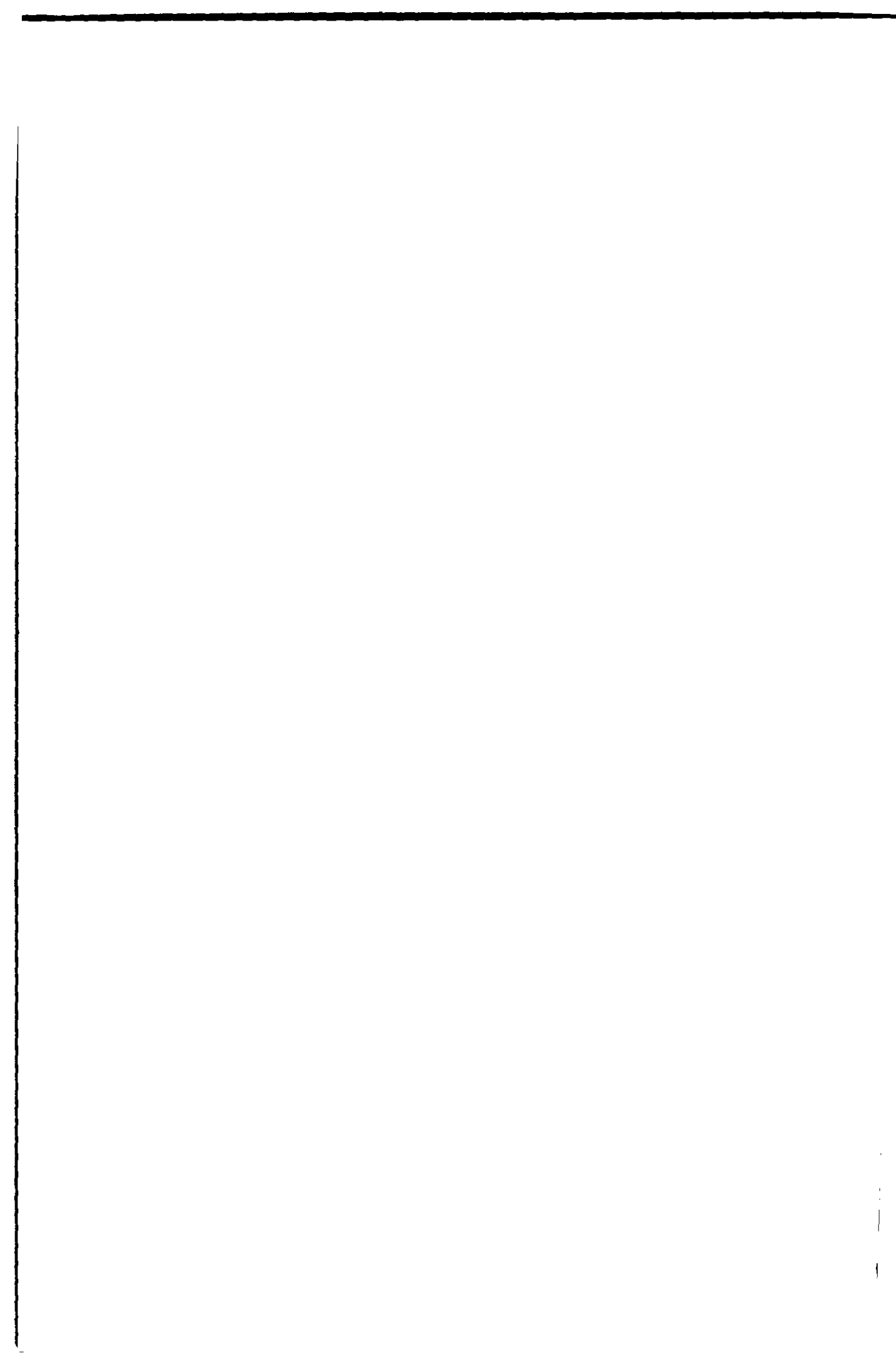


### 2.3. Mekanisme Kontrasepsi Zona Pelusida

Tujuan utama pengembangan vaksin antifertilitas adalah untuk membuat imunisasi aktif terhadap sperma, ovum, zigot, embrio dini (pra implantasi) maupun terhadap hormon *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) (Jones, 1996; Kaul *et al.*, 1996). Namun tiga metode terakhir nampaknya akan menimbulkan problem etika sosial, karena dapat dikategorikan sebagai abortivum. Pada hewan coba menunjukkan bahwa agen imunologis langsung bekerja pada gamet dapat mencegah fertilisasi (Epifano dan Dean, 1994).

Zona pelusida mamalia diketahui mengandung tiga macam protein terglykosilasi, yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3 dengan berat molekul masing-masing 137, 92 dan 62 KDa (Mc Cartney dan Mate, 1999). Glikoprotein zona pelusida mengandung sejumlah antigenik determinan termasuk karbohidrat, protein dan konformasi-konformasi epitopnya, yang imunogenesitasnya bervariasi pada mamalia (Skinner *et al.*, 1999).

Diantara komponen-komponen glikoprotein tersebut ZP3 adalah yang berperan penting dalam fertilisasi. Hal ini terbukti pada percobaan : mencit yang mempunyai defek pada gen pembentuk ZP3 (Ranklin *et al.*, 1996) dan ZP3 *null mice* tidak dapat membentuk zona pelusida yang dapat dibuahi sehingga mencit tersebut steril (Ranklin *et al.*, 1998; Ranklin *et al.*, 2001). Menurut Kiefer dan Saling (2002), pembentukan matriks zona pelusida dipengaruhi oleh furin proteolisis. Fungsi ZP3 adalah sebagai reseptor pengenalan terhadap spermatozoa, dimana sperma terikat pada reseptor ini melalui ikatan *O-linked oligosaccharide*. Peranan ZP2 adalah sebagai reseptor spermatozoa yang kedua, untuk menjaga





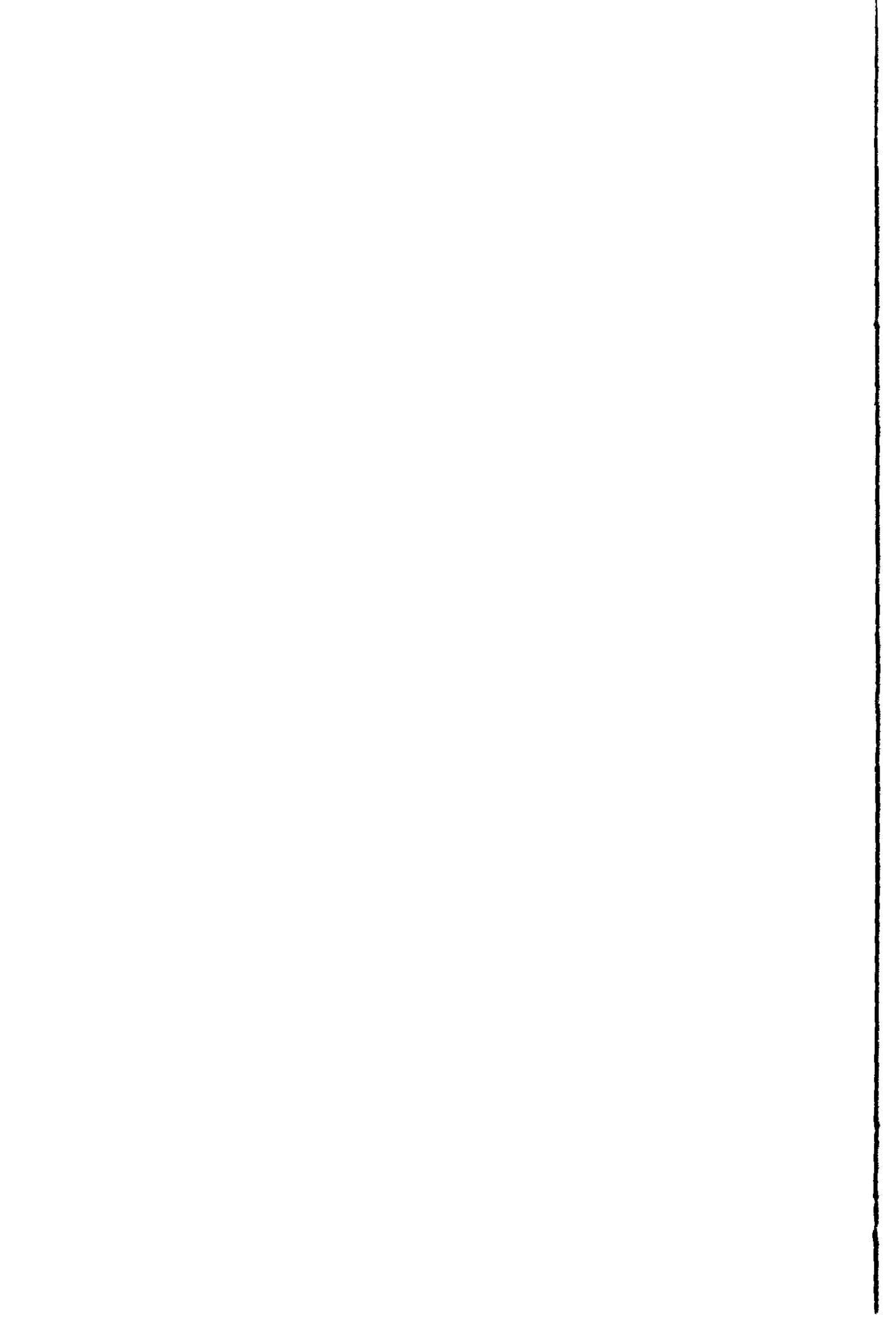
tetap terikatnya spermatozoa selama proses penembusan zona pelusida pada saat fertilisasi. ZP2 dan ZP3 membentuk kerangka yang dihubungkan dengan filamen ZP1 secara menyilang untuk membentuk struktur tiga dimensi (Tsubamoto *et al.*, 1999).

Thaler dan Cardullo (2002) melaporkan bahwa band 2 dan 3 hasil fraksinasi spermatozoa dapat terikat secara langsung pada ZP3. Ikatan antara sel spermatozoa dengan zona pelusida memiliki afinitas yang tinggi untuk mempertahankan posisi ikatan sel spermatozoa pada ekstra seluler matriks zona pelusida sebelum terjadinya reaksi akrosom.

Menurut Wassarman (1990) yang dikutip oleh Bazer *et al.* (1993) perlekatan kepala sel spermatozoa ke zona pelusida diatur oleh reseptor pada permukaan zona pelusida. Perlakuan ovum dengan anti zona antibodi atau dengan enzim proteolitik tripsin dapat menyebabkan blokade perlekatan sel spermatozoa atau pengikatannya pada zona pelusida. Ikatan antara sel spermatozoa dengan zona pelusida dapat juga dihambat bila dilakukan *pre treatment* sel spermatozoa dengan *anti sperm antibody* atau glikoprotein yang diekstraksi dari zona pelusida. Antibodi terhadap sperma atau zona pelusida dapat menutup seluruh reseptor pada permukaan sel spermatozoa dan juga pada zona pelusida.

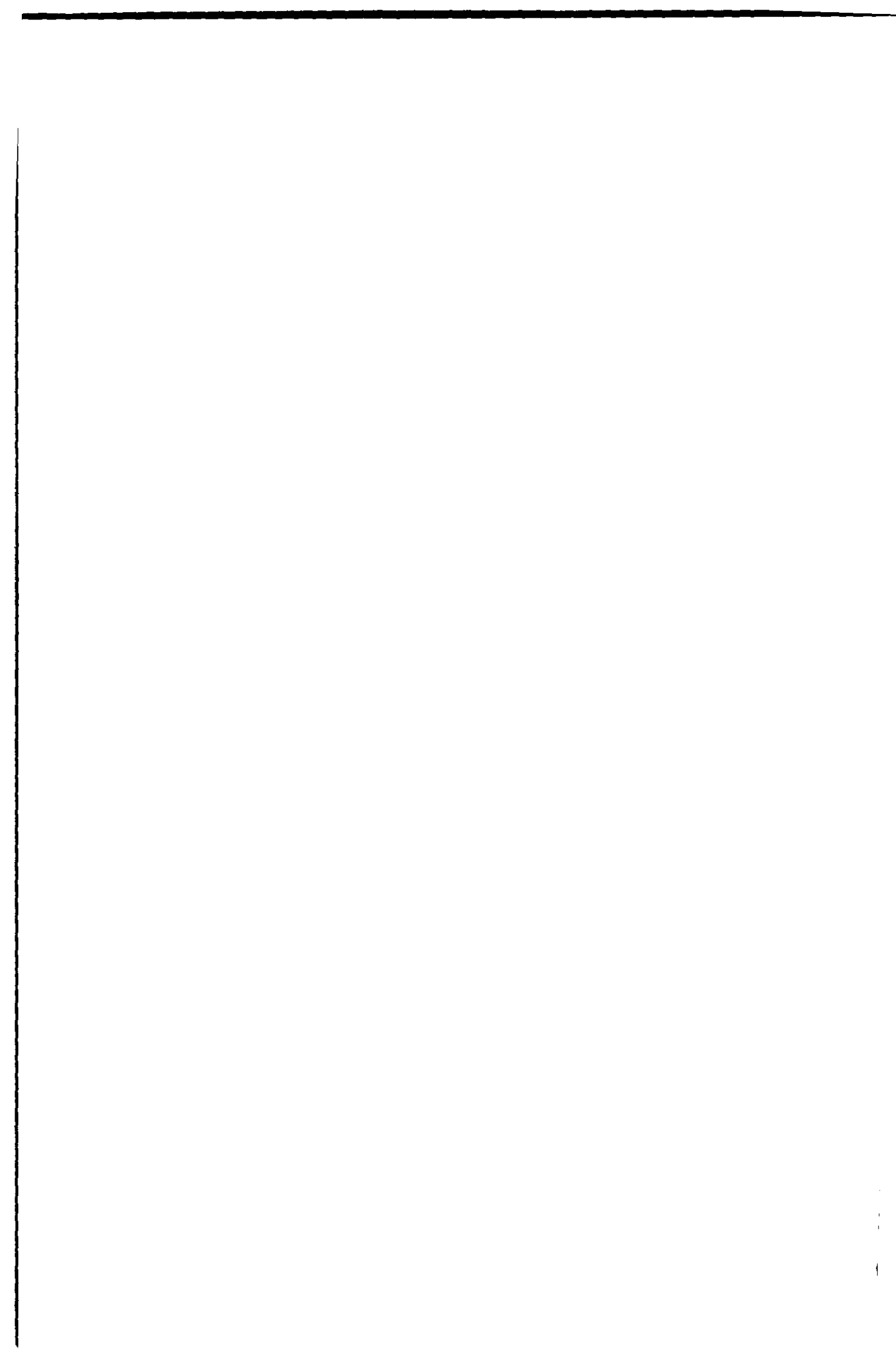
#### **2.4. Peranan Kontrasepsi Zona Pelusida**

Preparat zona pelusida dapat dipakai sebagai vaksin untuk mengendalikan populasi satwa liar di habitatnya (Bradley *et al.*, 1999), yaitu rusa (Miller *et al.*, 1999), kera baboon (Martinez dan Harris, 2000), serta pada gajah Afrika (Fayrer-



Hosken *et al.*, 1999). Pada manusia, vaksin kontraseptif di masa mendatang akan menjadi suplemen yang penting pada program keluarga berencana. Hal ini disebabkan karena spesifisitas yang tinggi (hanya bekerja pada gamet), efek samping yang rendah, harga yang lebih murah dan penggunaannya tidak sesering pada penggunaannya preparat kontrasepsi hormonal yang ada saat ini (Naz *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1999).

Penelitian pendahuluan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa vaksinasi mencit (*Mus musculus*) betina dengan preparat *crude* zona pelusida kambing lokal dalam *Freud adjuvant*, ternyata dapat mencegah kebuntingan pada seluruh hewan coba setelah hewan coba perlakuan dikawinkan. Pemeriksaan preparat histologis ovarium hewan coba menunjukkan adanya gambaran penurunan jumlah folikel sekunder sampai dengan folikel de Graaf, sedangkan folikel primer dan korpus luteum tidak berubah. Tidak terganggunya folikel primer disebabkan pada folikel tersebut karena pada oogonium belum dilapisi oleh zona pelusida, sehingga tidak menjadi target dari antibodi yang terbentuk akibat vaksinasi. Korpus luteum yang ada pada gambaran histologis tersebut diyakini sebagai sisa korpus luteum sebelumnya yang tidak mengalami regresi. Tidak regresinya korpus luteum tersebut disebabkan oleh terganggunya fungsi fisiologi endokrin akibat tidak berkembangnya folikel. Infertilitas hewan coba pada penelitian pendahuluan tersebut diikuti pula dengan perubahan siklus birahi hewan coba (Mustofa *et al.*, 2001). Terjadinya efek samping yang tidak diinginkan tersebut sama dengan laporan Paterson *et al.* (1999), yaitu terjadinya gangguan folikulogenesis setelah vaksinasi dengan preparat zona pelusida.



Menurut Lindau-Shepard et al. (2001) dalam perkembangan folikel terdapat reseptor FSH di permukaan zona pelusida yang juga dapat bereaksi secara immunologis dengan antibodi. Dengan demikian reseptor tersebut dapat mengalami blokade oleh antibodi dengan dilakukannya vaksinasi menggunakan preparat *crude* zona pelusida. Oleh karena itu, vaksinasi menggunakan epitop zona pelusida yang hanya berperan dalam pengenalan terhadap spermatozoa (ZP3) diyakini akan menimbulkan efek antifertilitas tanpa diikuti oleh timbulnya efek samping pada siklus perkembangan folikel maupun siklus birahi.

Namun penelitian lanjutannya dengan menggunakan zona pelusida fraksi 3 kambing (gZP3) dalam Freund Adjuvant, secara *in vivo* menunjukkan bahwa vaksinasi mencit (*Mus musculus*) dapat mencegah kebuntingan pada seluruh hewan coba tanpa ada perubahan siklus birahi (Mulyati et al., 2002). Siklus birahi yang tidak berubah merupakan petunjuk tidak terjadinya perubahan profil hormonnya. Sifat preparat kontrasepsi yang demikianlah yang dikehendaki.



## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

1. Mengetahui kemampuan uji imunofluoresen natif untuk identifikasi pengenalan homogenat membran plasma spermatozoa kambing terhadap zona pelusida kambing.
2. Menguji kemampuan identifikasi pengenalan homogenat membran plasma spermatozoa sapi pada homogenat zona pelusida kambing.

#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Hasil positif dari penelitian ini selanjutnya dapat dipakai sebagai dasar bagi pengujian ZP3 kambing sebagai bahan vaksin kontrasepsi di masa depan yang diharapkan tidak menimbulkan efek samping pada sistem endokrin reproduksi.





## BAB IV

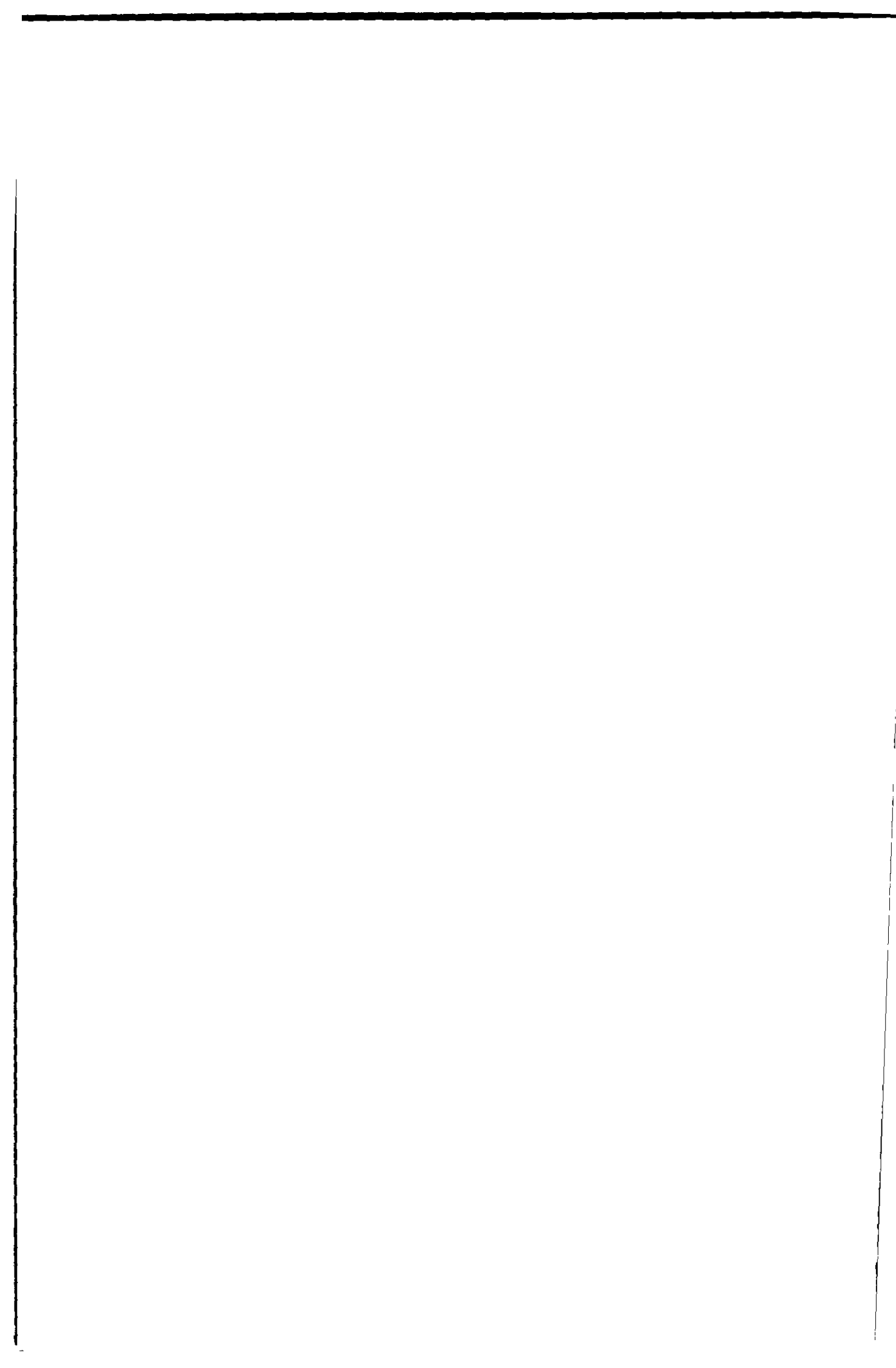
### MATERI DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif laboratorik, sehingga tidak membutuhkan hipotesis dan uji statistik. Pada penelitian ini bahan yang hendak diuji adalah spermatozoa yang mengandung matriks ekstra seluler yang diketahui mengandung reseptor fertilisasi. Terdapatnya reseptor tersebut dapat dikonfirmasi apabila terbukti dalam uji imunofluoresen bahwa spermatozoa tersebut dapat dikenali oleh homogenat zona pelusida hewan sejenis. Selanjutnya homogenat zona pelusida kambing tersebut dapat dikembangkan menjadi bahan dasar vaksin kontrasepsi di masa depan apabila homogenat tersebut dapat pula dikenali oleh homogenat spermatozoa manusia. Indikator bagi reaksi pengenalan tersebut adalah antibodi sekunder : antibodi anti ZP kambing yang diperoleh dari serum hasil vaksinasi pada mencit betina; dan antibodi sekunder : antibodi anti imunoglobulin kelinci berlabel FITC (R-1008, Sigma).

#### 4.1. Materi Penelitian

##### 4.1.1. Bahan Penelitian

Bahan penelitian adalah ovarium kambing asal Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirikan Surabaya, semen kambing, semen sapi, antibodi I / primer yaitu antibodi anti zona pelusida dari mencit, antibodi II / sekunder (Anti Rabbit IgG dengan label *fluoresence isothiocyante* / FITC) *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (sigma), *Bovine Serum Albumin* (BSA) (sigma), NaCl fisiologis, antibiotika gentamicin, methanol dan aquades.



#### 4.1.2. Peralatan Penelitian

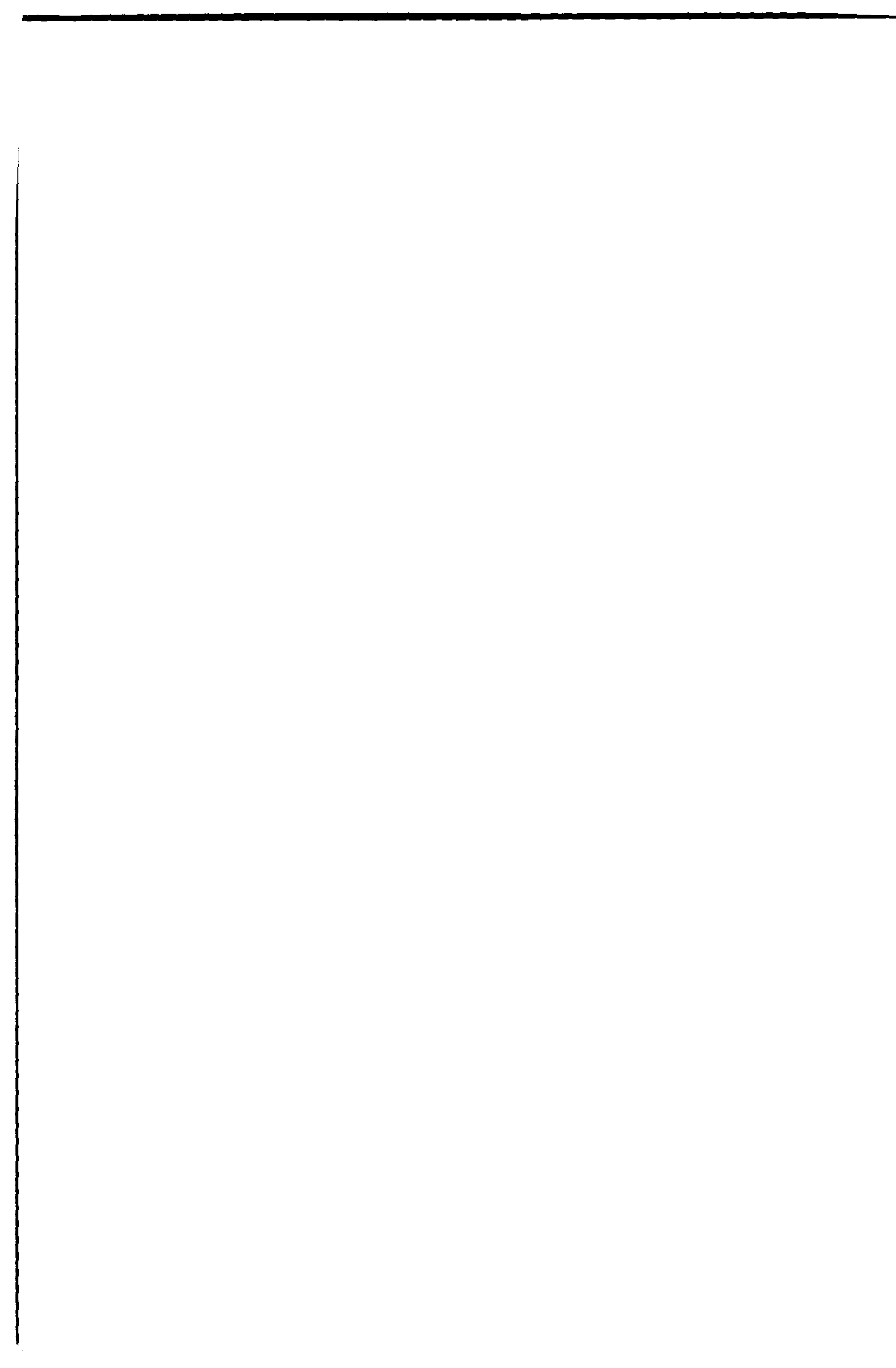
Peralatan penelitian yang digunakan adalah : skalpel, gunting, pinset, spuit disposibel 5 ml dengan jarum 18 G, spuit tuberkulin dan jarumnya, cawan petri diameter 35 mm dan 90 mm, tabung koleksi, mikropipet 10  $\mu$ l dan 50  $\mu$ l (Eppendorf varipipette) dengan ujung pipet (*pipette tip*), sentrifugator (Hettich EBA 3S), timbangan mikro (Electronic Balance CHYO JP2-160), tabung Ependroff, mikroskop *disecting* (Meiji, Japan), mikroskop Ultra Violet (Nikon, Japan), *Ultrasonic Homogenizer* dengan probe 2 mm, gelas obyek dan gelas cover.

#### 4.2. Metode Penelitian

##### 4.2.1. Preparasi Zona Pelusida

Ovarium kambing diperoleh dari RPH. Pegirikan Surabaya dicuci dengan NaCl fisiologis dimasukkan thermos dan dibawa ke Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Selanjutnya dilakukan penanganan aspirasi cairan folikel secepatnya dengan spuit disposibel 5 ml dengan jarum 18 G yang telah berisi cairan PBS. Aspirasi oosit dikerjakan dengan melakukan penusukan dari beberapa folikel dengan diameter 2-3 mm pada satu ovarium selanjutnya ganti ovarium berikutnya, selanjutnya cairan folikel ditampung pada tabung koleksi. Cairan folikel koleksi dituangkan ke cawan petri dan ditempatkan pada lapang pandang mikroskop *disecting*.

Zona pelusida dipisahkan dengan cara memecah oosit untuk dikeluarkan isinya pada pemeriksaan mikroskop *disecting* sesuai dengan prosedur yang telah



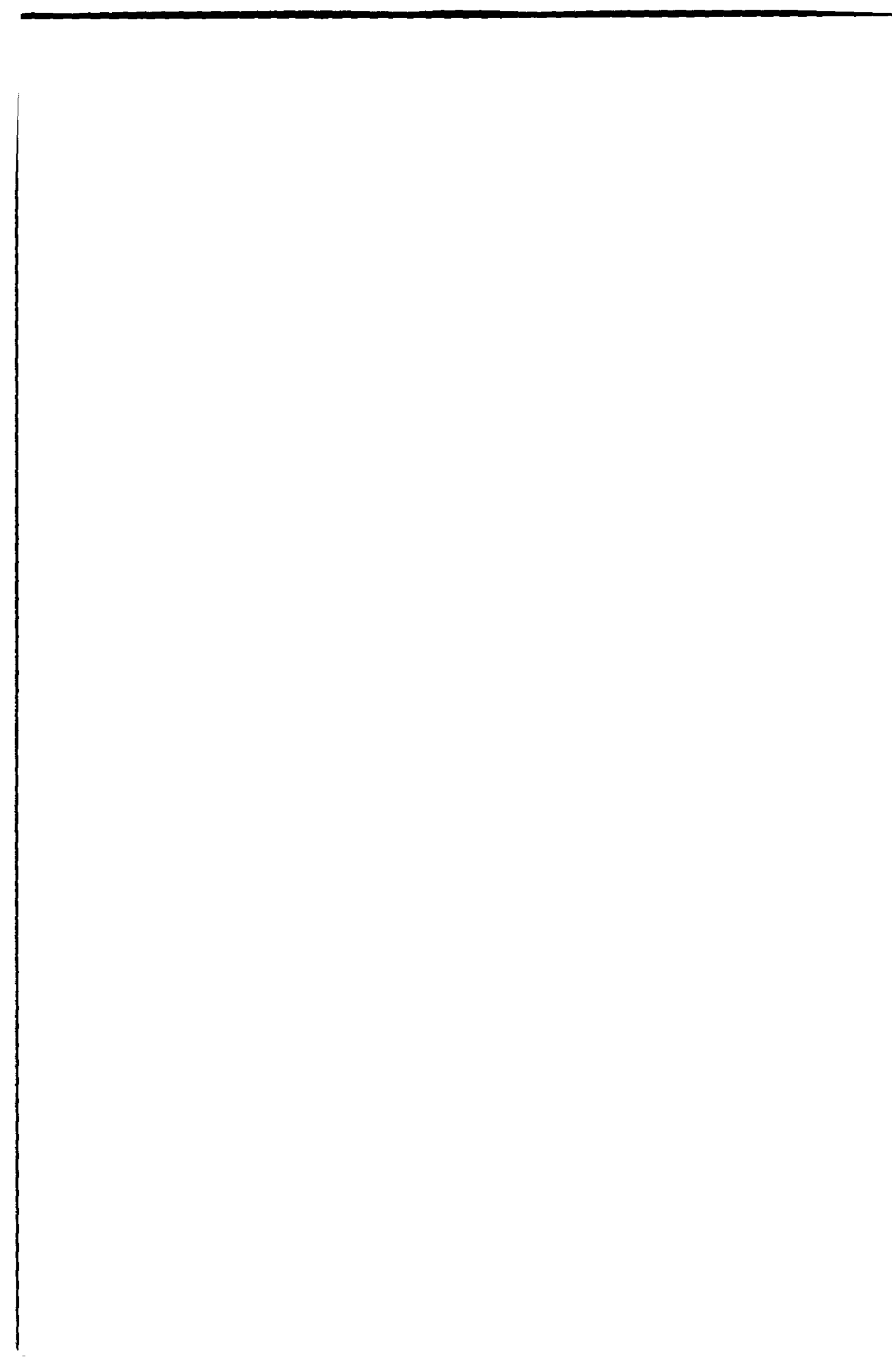
dilakukan Mustofa *et al.* (1999) dan Utama *et al.* (2000), yang merupakan protokol baku di Laboratorium Kebidanan Sub Lab. Fertilisasi In Vitro. Zona pelusida yang diperoleh tersebut telah bebas dari sel-sel kumulus maupun vitelus dikoleksi dalam tabung Eppendorf sampai jumlahnya terpenuhi.

Zona pelusida yang terkumpul dicuci tiga kali masing-masing dengan sentrifugasi 700 g selama 10 menit. Pelet (*Pellet*) zona pelusida yang diperoleh dimasukkan pada vial plastik, selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode sonikasi menggunakan *Ultrasonic Homogenizer*. Pekerjaan preparasi *goat Zona Pellucida* (gZP) ini dilakukan di Laboratorium *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga.

#### 4.2.2. Pembuatan Antibodi Anti Zona Pelusida

Antibodi anti zona pelusida (ZP) dibuat dengan cara melakukan vaksinasi pada mencit betina dengan 150  $\mu$ l suspensi yang mengandung 200  $\mu$ g homogenat zona pelusida kambing dalam *Complete Freud Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1 : 1. Penyuntikan *booster* dilakukan dua kali dengan interval sebelas hari dengan dosis sama dalam *Incomplete Freud Adjuvant* (IFA) dalam perbandingan 1 : 1.

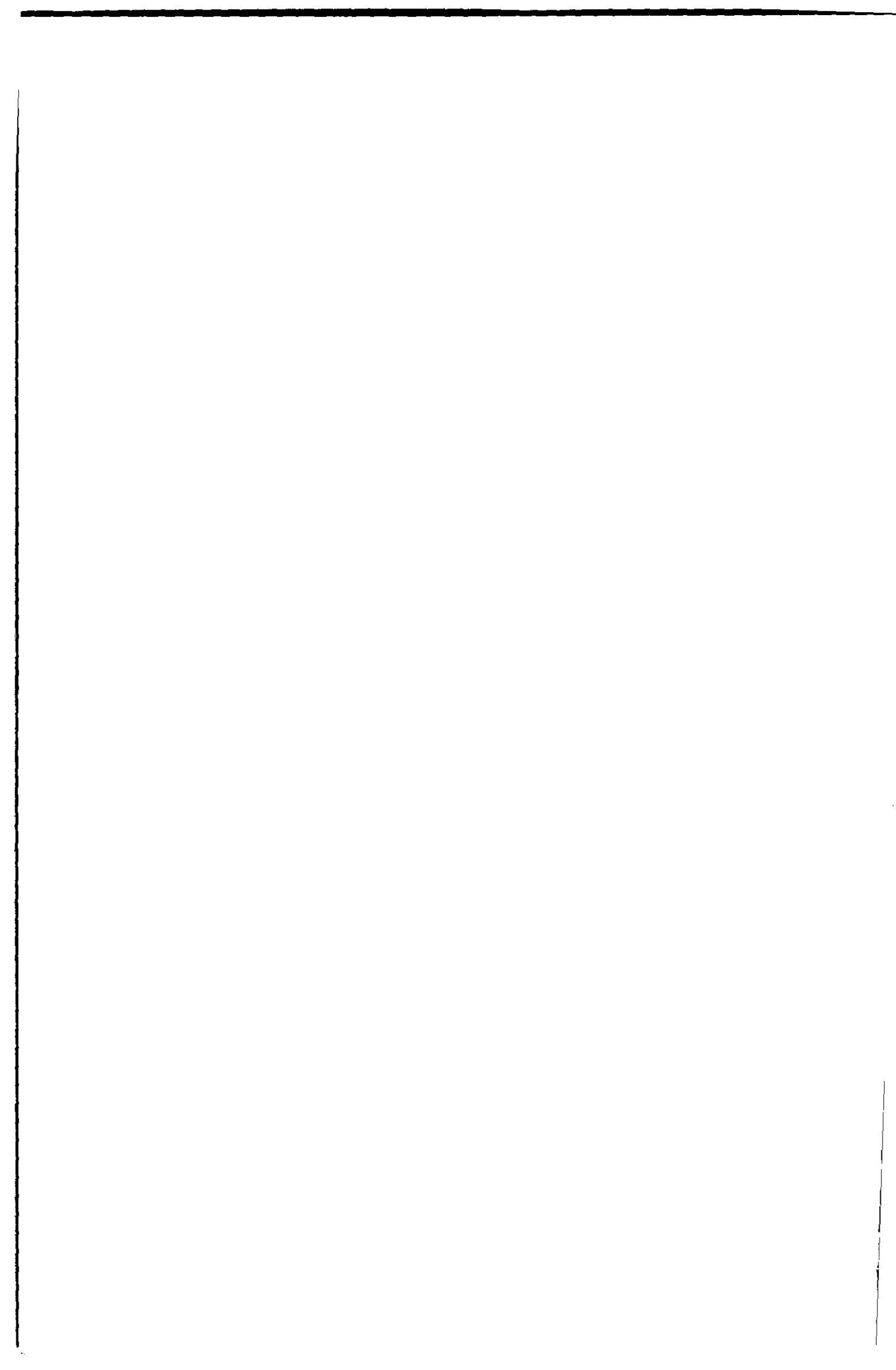
Pengambilan darah untuk mendapatkan antibodi anti zona pelusida dilakukan pada hari ketujuh setelah penyuntikan *booster* yang terakhir. Darah untuk koleksi serum diambil dari sudut mata luar mencit dengan pipet mikro hematokrit, darah yang menetes ditampung dalam tabung Eppendorf kemudian didiamkan 10 menit dalam suhu kamar. Serum diperoleh dengan cara melakukan



sentrifugasi darah dalam tabung Eppendorf dengan kecepatan 400 g selama 15 menit, sehingga terbentuk dua lapisan. Supernatan yang terjadi merupakan serum, dipisahkan dengan cara menghisap dengan pipet pelan-pelan, sedangkan endapan berupa eritrosit dibuang. Serum yang merupakan antibodi anti zona pelusida tersebut disimpan beku dalam lemari es sampai dengan saatnya dibutuhkan.

#### **4.2.3. Imunofluoresen Natif**

Semen kambing dibuat preparat ulas di atas gelas objek, kemudian difiksasi dengan metanol selama 60 menit. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1 % selama 15 menit. Homogenat zona pelusida dari kambing dituangkan di atas preparat kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit, selanjutnya dicuci seperti di atas. Antibodi sekunder (anti rabbit Ig G dengan label FITC) ditambahkan, sekali lagi dicuci. Preparat diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet.





### 4.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang dikerjakan adalah sebagai berikut :

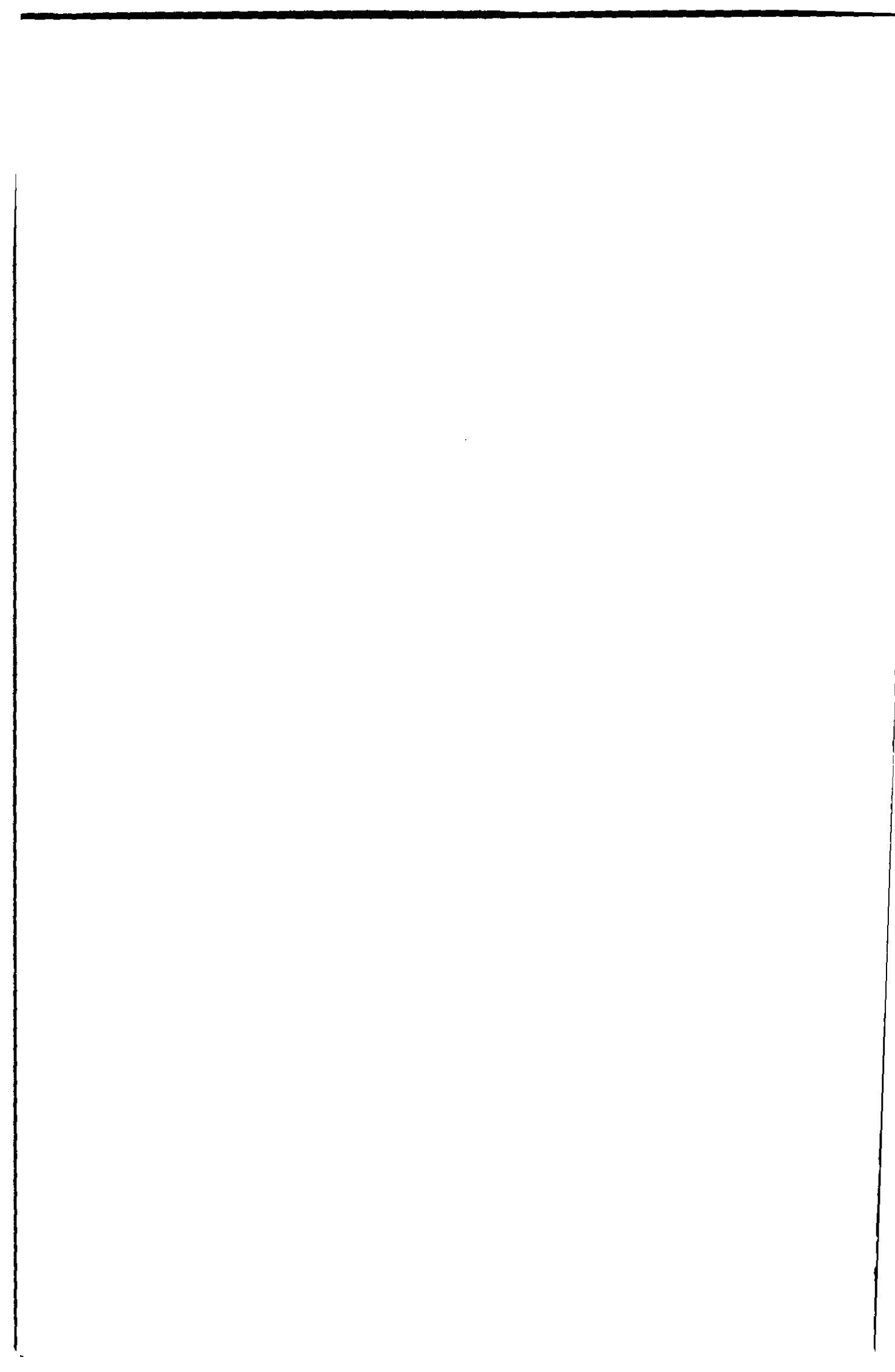
	<b>g-Spz</b>	<b>H-g-ZP</b>	<b>Ab I</b>	<b>Ab II</b>
Penelitian I	-	+	+	+
Penelitian II	+	-	+	+
Penelitian III	+	+	+	+
	<b>b-Spz</b>	<b>H-g-ZP</b>	<b>Ab I</b>	<b>Ab II</b>
Penelitian IV	+	-	+	+
Penelitian V	+	+	+	+

Keterangan :

- g-Spz : Spermatozoa kambing
- b-Spz : Spermatozoa sapi
- H-g-ZP : Homogenat zona pelusida kambing
- Ab I : Antibodi primer
- Ab II : Antibodi sekunder.

#### 4.3.1. Penelitian I

Homogenat zona pelusida kambing dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol selama  $\pm 15$  menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1 % selama  $\pm 15$  menit. Reaksikan dengan antibodi I (antibodi anti zona pelusida), inkubasikan pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Reaksikan dengan antibodi II (*konjugate rabbit Immunoglobulin G* yang dilabel dengan FITC). Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Preparat tersebut selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet (pembesaran 400 kali).



#### 4.3.2. Penelitian II

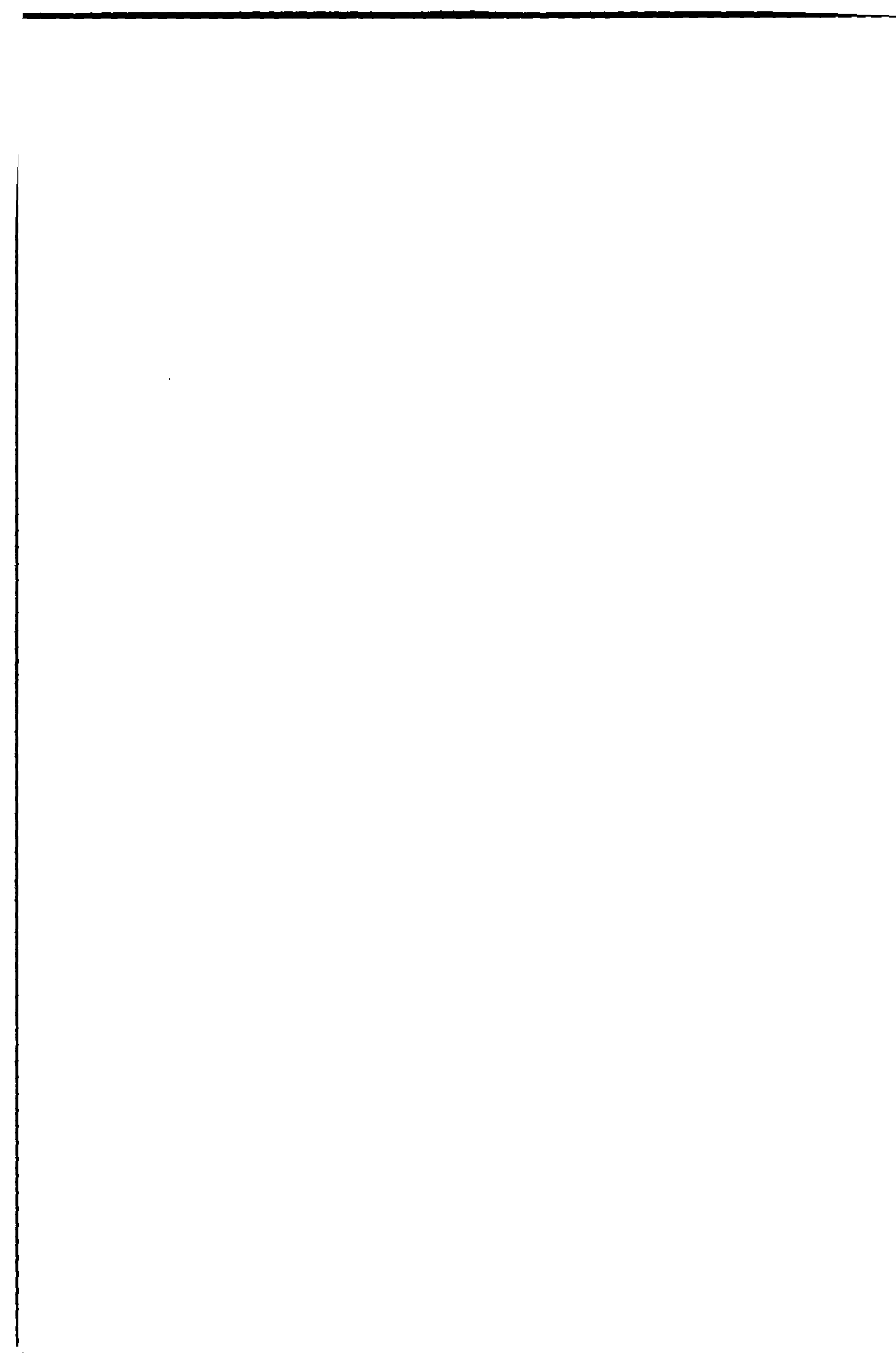
Semen kambing dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan dibiarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol selama  $\pm 15$  menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1 % selama  $\pm 15$  menit. Reaksikan dengan antibodi I, inkubasikan pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Reaksikan dengan antibodi II. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Preparat tersebut selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet.

#### 4.3.3. Penelitian III

Spermatozoa kambing dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol selama  $\pm 15$  menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1 % selama  $\pm 15$  menit. Teteskan homogenat ZP kambing diatas preparat ulas dan ratakan pelan-pelan. Reaksikan dengan antibodi I, inkubasikan pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Reaksikan dengan antibodi II. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Preparat tersebut selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet.

#### 4.3.4. Penelitian IV

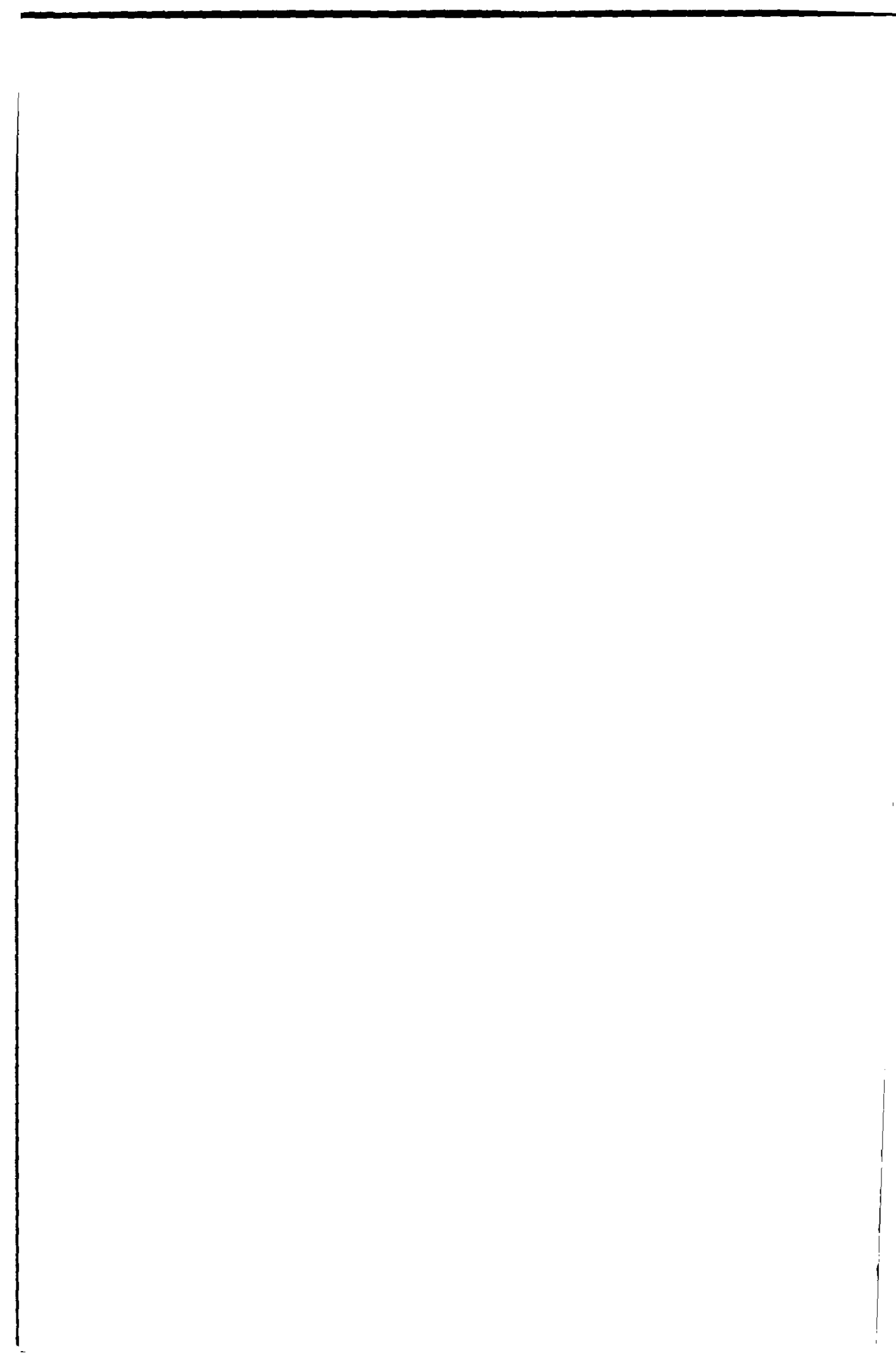
Homogenat ZP sapi dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol selama  $\pm 15$  menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1 % selama  $\pm 15$  menit. Reaksikan dengan antibodi I (antibodi anti zona pelusida) kambing, inkubasikan pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1 %.



Reaksikan dengan antibodi II (*konjugate rabbit Immunoglobulin G* yang dilabel dengan FITC). Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Preparat tersebut selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet (pembesaran 400 kali).

#### **4.3.5. Penelitian V**

Semen sapi dibuat preparat ulas gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol selama  $\pm 15$  menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1 % selama  $\pm 15$  menit. Teteskan homogenat ZP kambing dan ratakan dengan hati-hati. Reaksikan dengan antibodi I kambing, inkubasikan pada inkubator dengan suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1%. Reaksikan dengan antibodi II. Cuci dengan PBS + BSA 1 %. Preparat tersebut selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop Ultra Violet.



## BAB V

### HASIL PENELITIAN

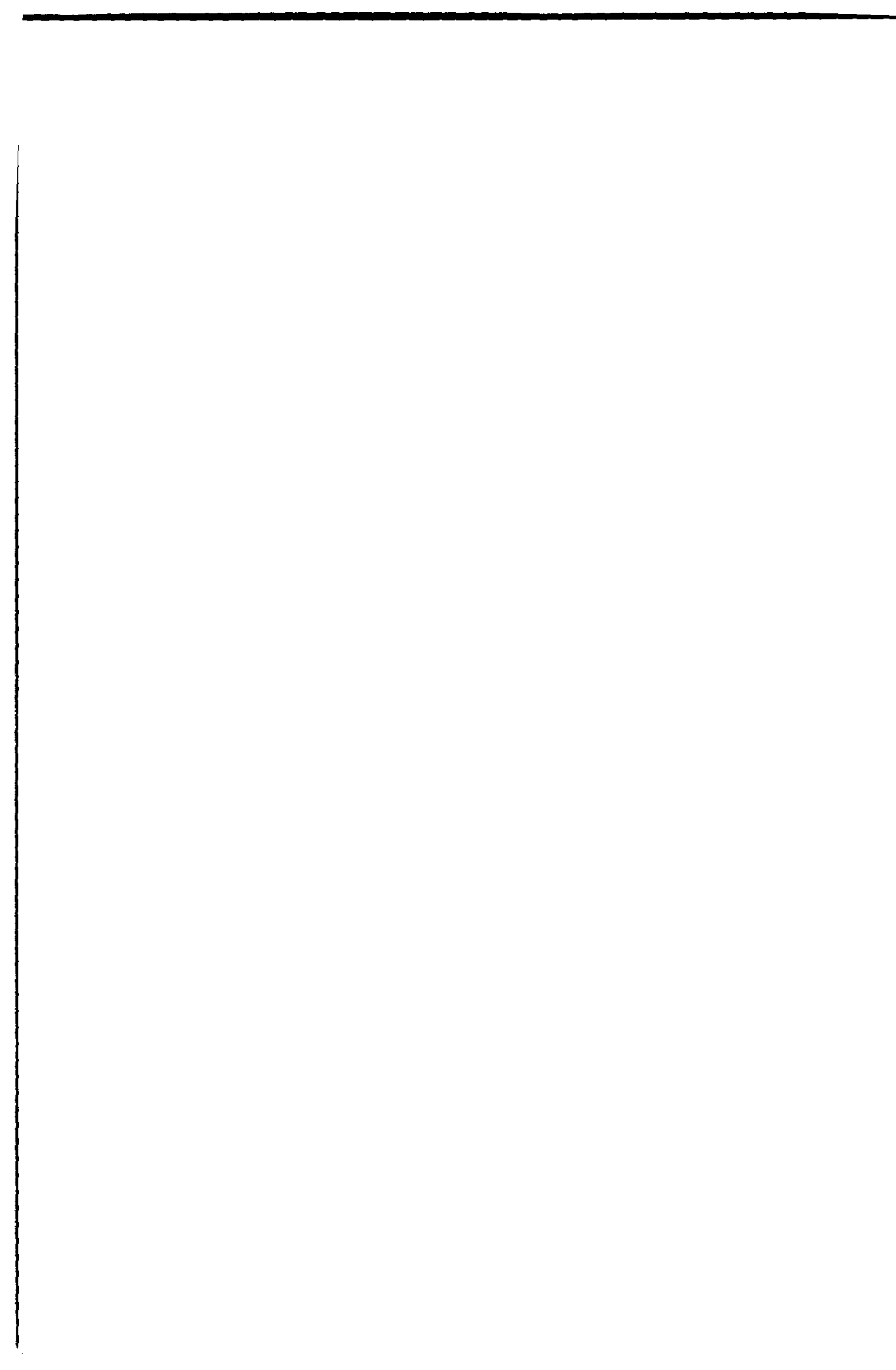
Hasil penelitian dari pengamatan *visuil* preparat natif yang dibuat pada gelas obyek dari penelitian I, II, III, IV dan V selanjutnya dilihat di bawah mikroskop Ultra Violet (UV) pembesaran 400 kali adalah sebagai berikut :

#### 5.1. Penelitian I

Pemeriksaan mikroskopis dengan mikroskop UV, preparat ulas homogenat zona pelusida (ZP) kambing yang ditambahkan antibodi I / antibodi primer (antibodi anti ZP ) kambing, selanjutnya ditambakan dengan antibodi II / antibodi sekunder (*conjugate rabbit Immunoglobulin G* yang dilabel dengan *fluoresence isothiocyante*. Menghasilkan gambar sel-sel homogenat zona pelusida yang berfluoresensi.

#### 5.2 Penelitian II

Pada pemeriksaan mikroskopis preparat ulas dari spermatozoa kambing yang ditambahkan antibodi I (antibodi anti ZP ) kambing selanjutnya dengan antibodi II (*conjugate rabbit Immunoglobulin G* yang dilabel dengan *fluoresence isothiocyante*, ternyata tidak menghasilkan gambaran sel spermatozoa yang berfluoresensi.





### 5.3. Penelitian III

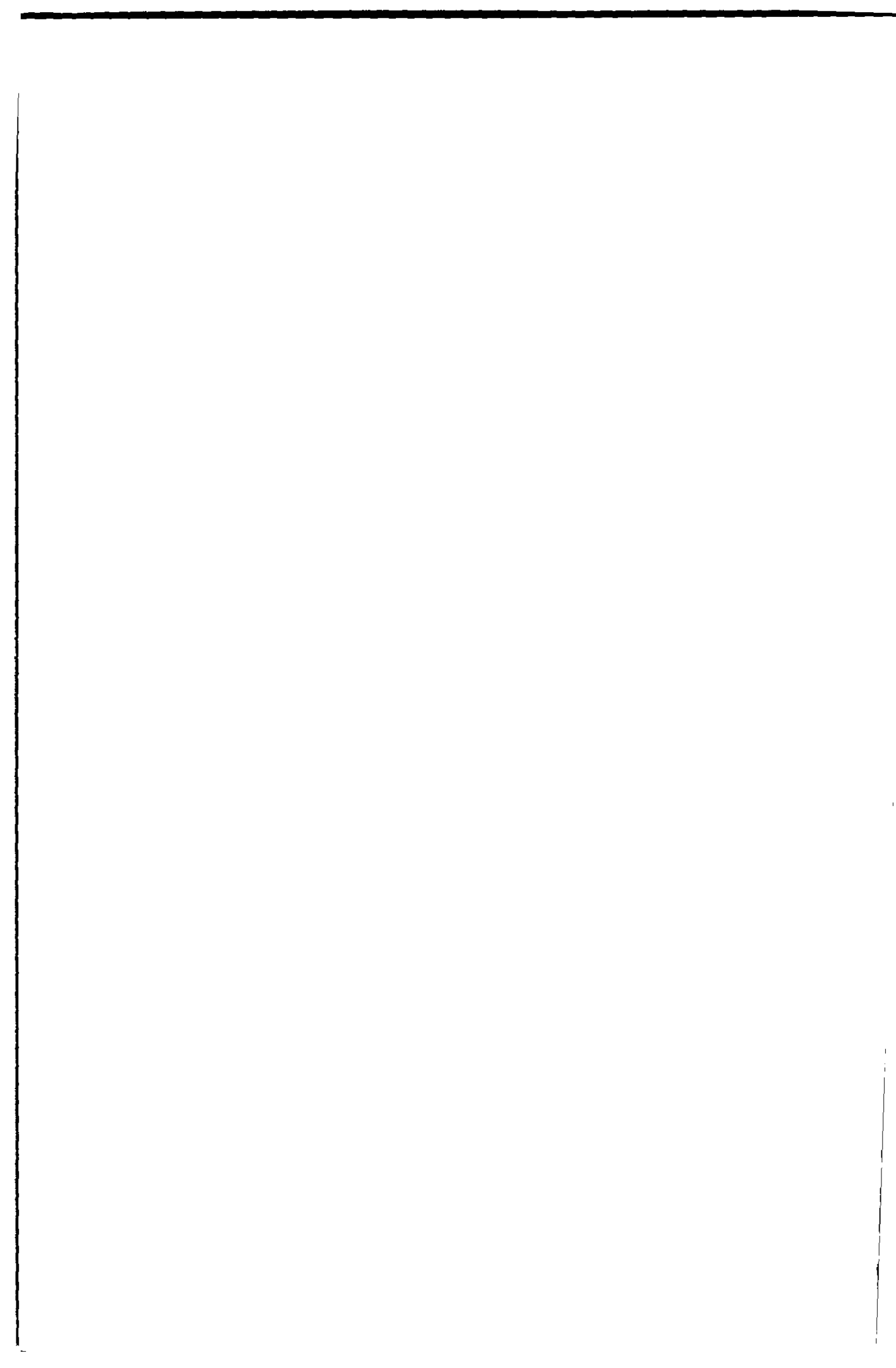
Pemeriksaan mikroskopis preparat ulas spermatozoa kambing ditambahkan homogenat zona pelusida kambing, selanjutnya ditambahkan antibodi I, dan antibodi II yang dilabel dengan *fluoresence isothiocyante*. Menghasilkan gambar sel-sel spermatozoa yang berfluoresensi. Tampak dengan jelas sel speratozoa memancarkan sinar hijau fluoresen, terutama di bagi kepala spermatozoa.

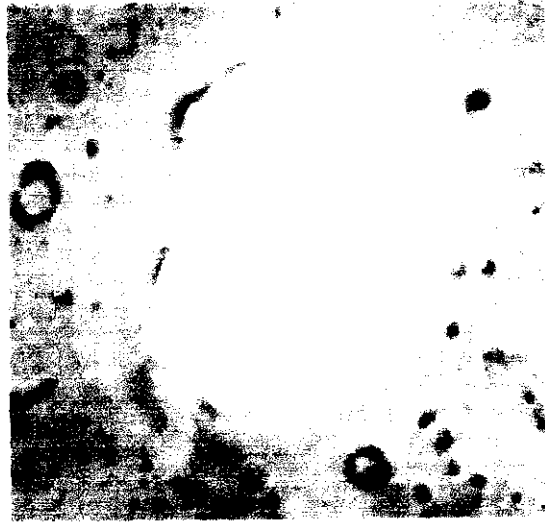
### 5.4. Penelitian IV

Pada pemeriksaan mikroskopis preparat ulas keempat yaitu dari spermatozoa sapi yang ditambahkan antibodi I selanjutnya ditambahkan antibodi II, ternyata tidak menghasilkan gambaran sel spermatozoa yang berfluoresensi.

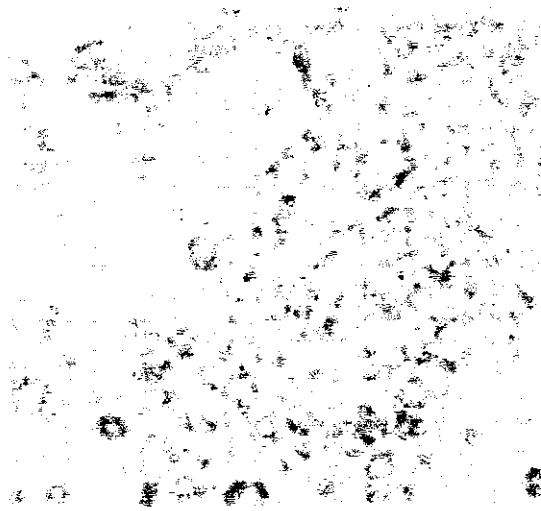
### 5.5. Penelitian V

Pemeriksaan mikroskopis preparat ulas spermatozoa sapi ditambahkan homogenat zona pelusida kambing, selanjutnya ditambahkan antibodi I (antibodi anti Z.P ) kambing, dan antibodi II yang dilabel dengan *fluoresence isothiocyante*. Menghasilkan gambar sel spermatozoa yang tidak berfluoresensi.

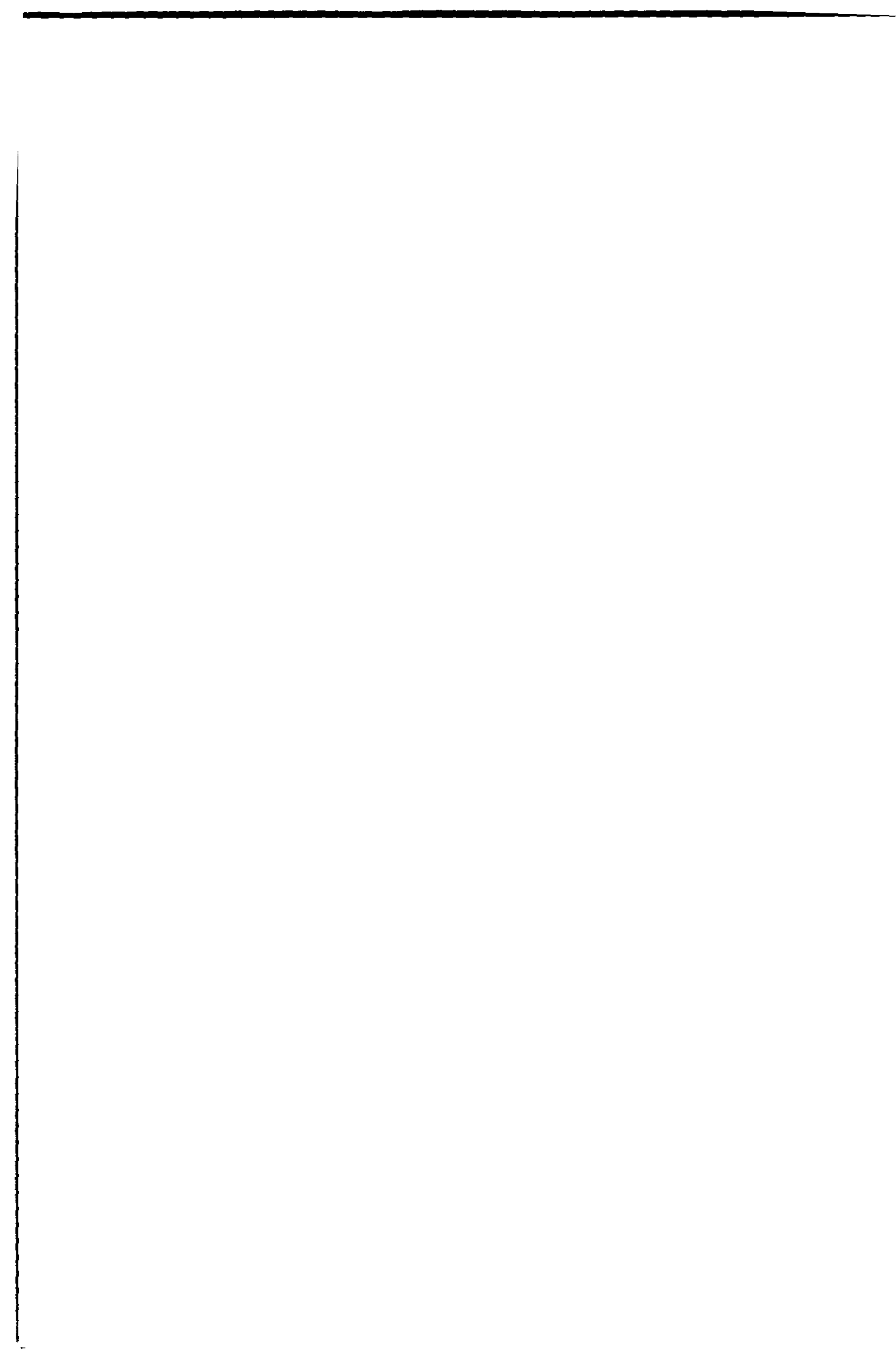




Gambar 1. Homogenat zona pelusida kambing yang berfluoresensi (Penelitian I)  
Mikroskop Ultra Violet pembesaran 400 kali

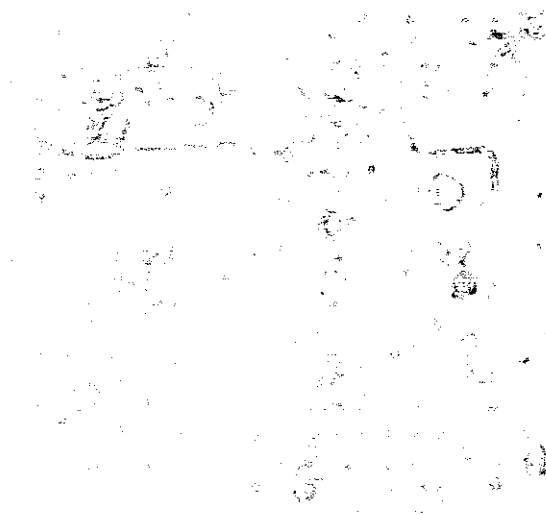


Gambar 2. Spermatozoa kambing yang tidak berfluoresensi (Penelitian II)  
Mikroskop Ultra Violet pembesaran 400 kali



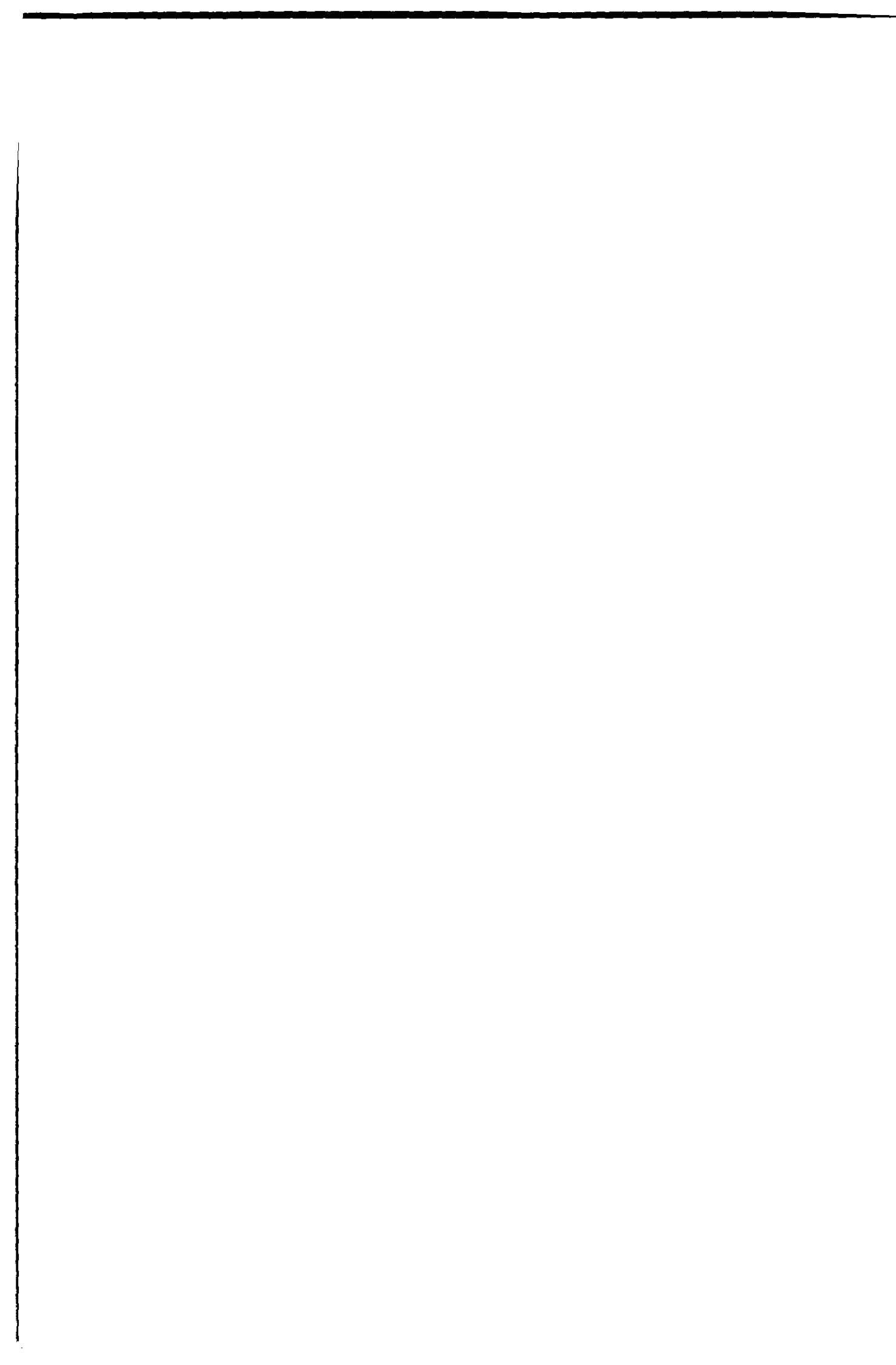


Gambar 3. Spermatozoa kambing yang berfluoresensi (Penelitian III)  
Mikroskop Ultra Violet pembesaran 400 kali

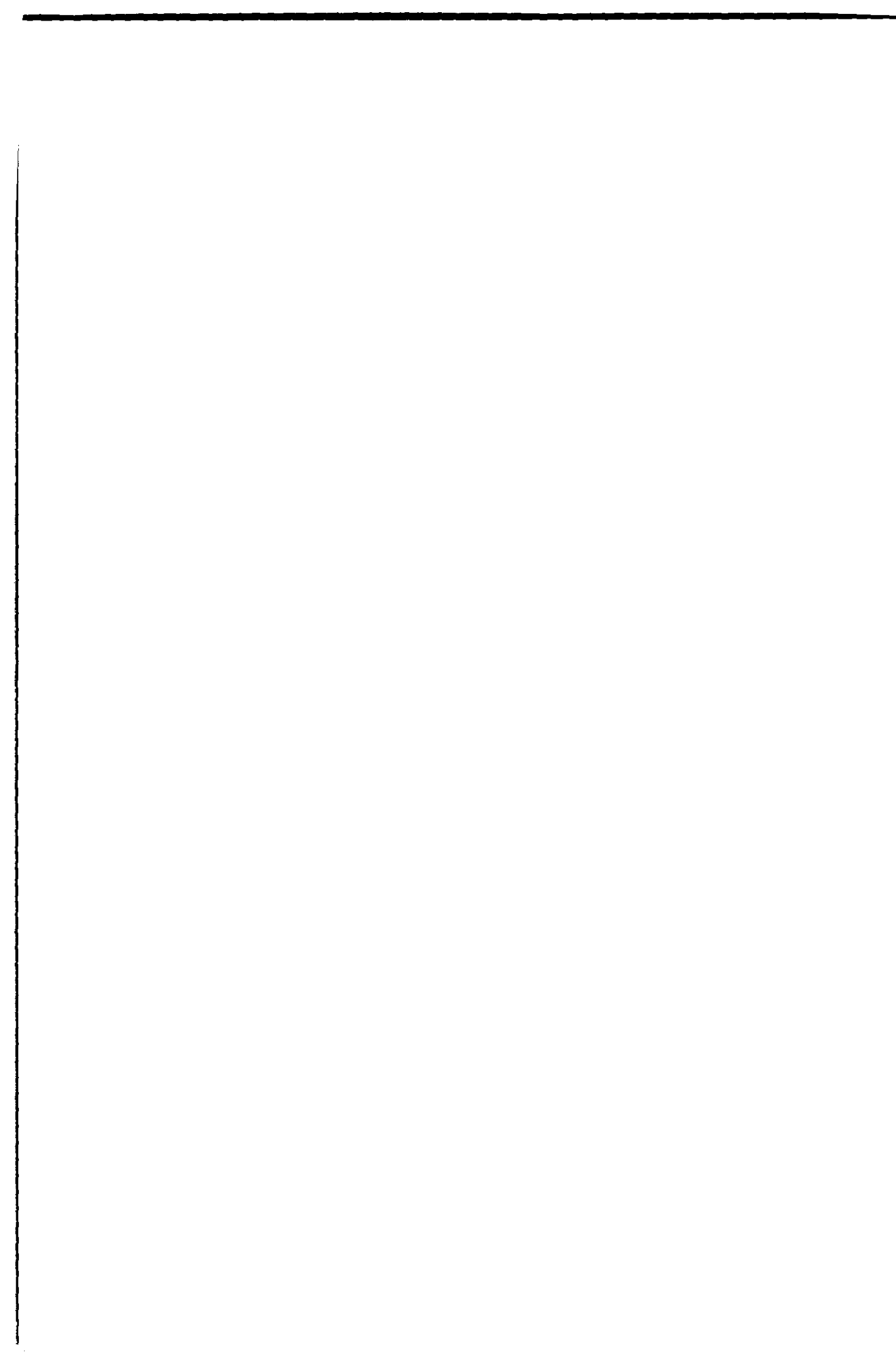


Gambar 4. Spermatozoa sapi yang tidak berfluoresensi (Penelitian IV).  
Mikroskop Ultra Violet pembesaran 400 kali

PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SERANG



Gambar 5. Spermatozoa yang tidak berfluoresensi (Penelitian V)  
Mikroskop Ultra Violet pembesaran 400 kali





## BAB VI

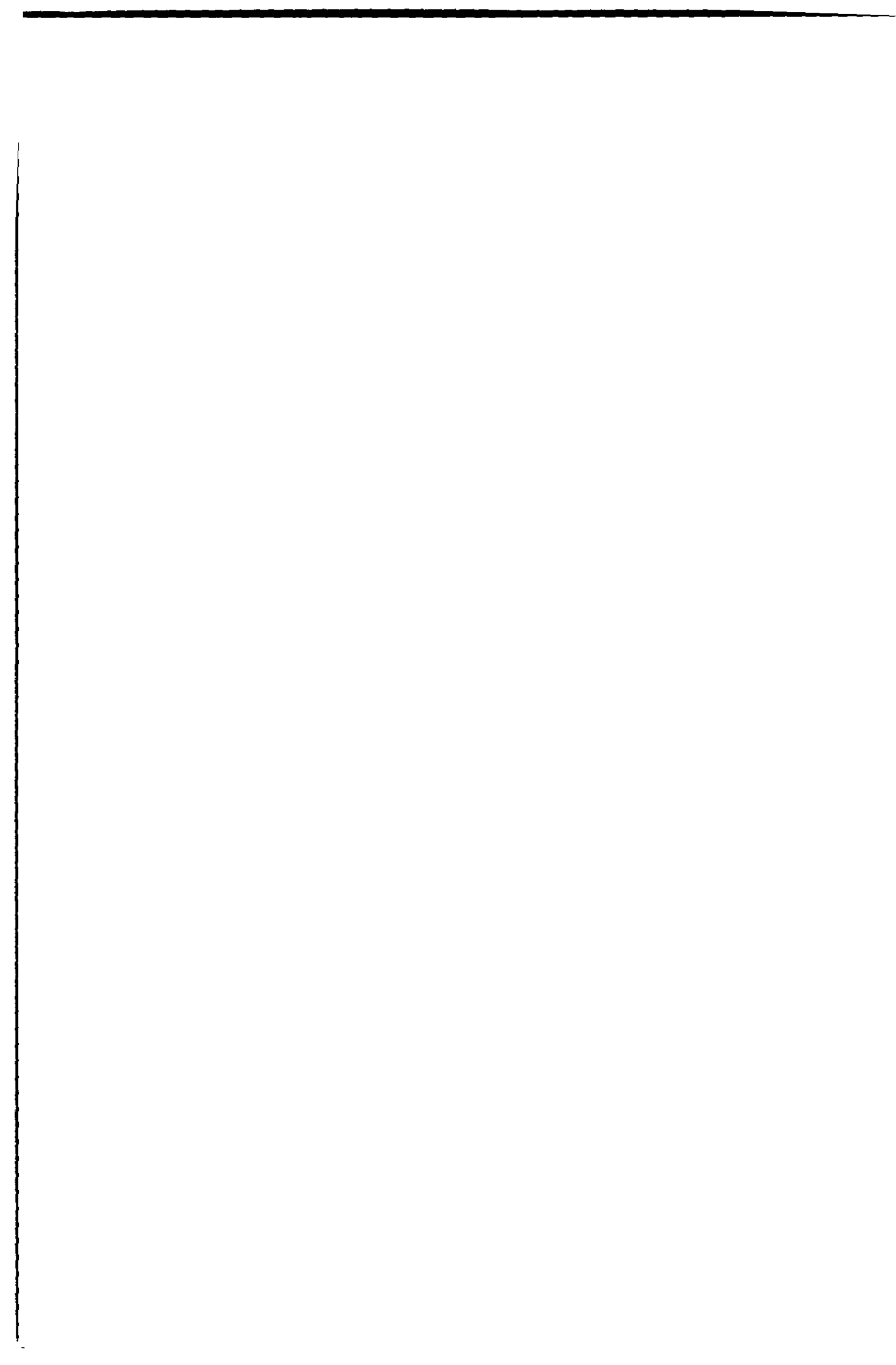
### PEMBAHASAN

#### 6.1. Penelitian I

Hasil dari penelitian I menunjukkan bahwa homogenat zona pelusida yang berasal dari oosit kambing mampu berikatan dengan antibodi primer. Antibodi I tersebut berasal dari serum hasil dari vaksinasi homogenat zona pelusida (ZP) kambing pada mencit. Antibodi I tersebut adalah spesifik terhadap ZP kambing. Antibodi primer selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder yang berasal dari serum kelinci yang telah dilabel dengan *fluoresence isothiocyante* (FITC). Sehingga pada pemeriksaan preparat natif dengan mikroskop Ultra Violet (UV) tampak fraksi zona pelusida memancarkan warna fluoresensi.

Menurut Istianah (2000), zona pelusida kambing yang disuntikkan pada mencit betina akan merangsang timbulnya antibodi spesifik dan antibodi non spesifik. Respon imun spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dan dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Bila zona pelusida ini baru pertama kali masuk ke dalam tubuh, maka sistem fagositik polimorfonuklear (PMN) dan sistem fagositik morfonuklear akan mengikat, menelan dan menghancurkan zona pelusida melalui proses yang dikenal sebagai fagositosis. Apabila tidak semua antigen yang masuk ke dalam tubuh dihancurkan, maka antigen ini akan merangsang respon imun spesifik untuk menghasilkan imunoglobulin (Ig).

Penelitian I ini merupakan penelitian kontrol, karena ZP kambing mampu mengikat antibodi yang terbentuk dari hasil vaksinasi homogeat ZP kambing.



Zona pelusida kambing mempunyai reseptor untuk mengikat antibodi primer. Selanjutnya berikatan dengan antibodi sekunder yang merupakan ligand sehingga terjadi binding.

## **6.2. Penelitian II**

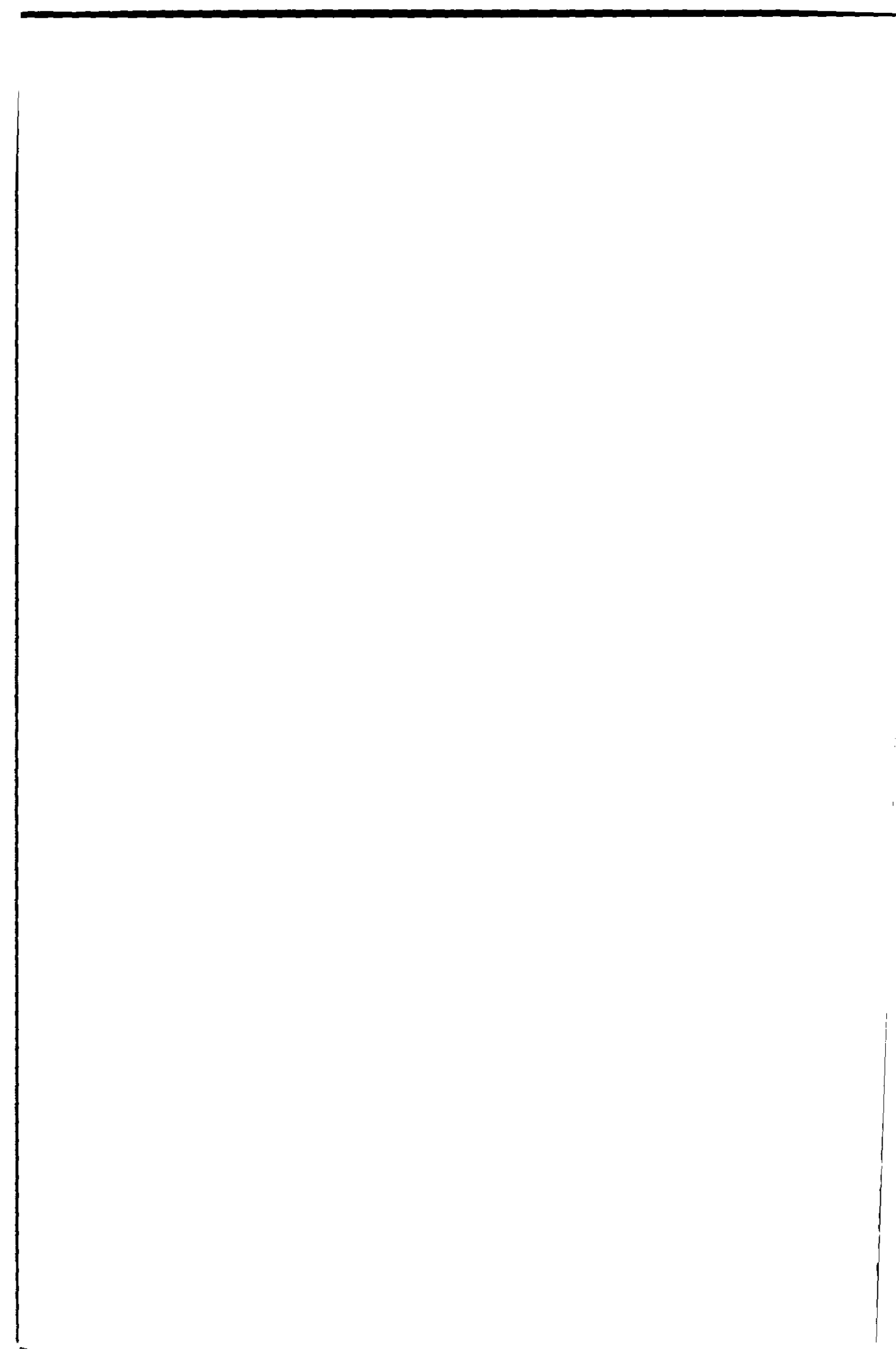
Hasil dari penelitian II spermatozoa kambing tidak dapat mengikat antibodi I, karena spermatozoa tidak mempunyai reseptor terhadap antibodi I (antibodi dari ZP kambing). Selanjutnya antibodi I tidak dapat berikatan dengan Antibodi II. Kejadian ini nampak terlihat pada mikroskop UV gambaran sel spermatozoa tidak berfluoresensi.

Pada penelitian II ini menjelaskan bahwa spermatozoa kambing tidak akan berikatan dengan antibodi I karena reseptor yang dimiliki spermatozoa tidak cocok terhadap antibodi I, selanjutnya tidak mengikat ligand dari antibodi II dan akhirnya tidak terjadi binding.

## **6.3. Penelitian III**

Pada penelitian III spermatozoa kambing berikatan dengan homogenat ZP kambing (hewan sejenis), selanjutnya homogenat ZP kambing berikatan dengan antibodi I, antibodi I berikatan dengan antibodi II yang dilabel dengan dengan *fluorescence isothiocyanate*. Sehingga pada pemeriksaan preparat di bawah mikroskop UV tampak sel spermatozoa memancarkan sinar fluoresensi.

Penelitian III ini merupakan pembuktian adanya reseptor fertilisasi pada homogenat ZP kambing. Sehingga spermatozoa kambing berikatan dengan



homogenat ZP kambing, selanjutnya dengan antibodi I dan antibodi II dari hewan sejenis (homolog).

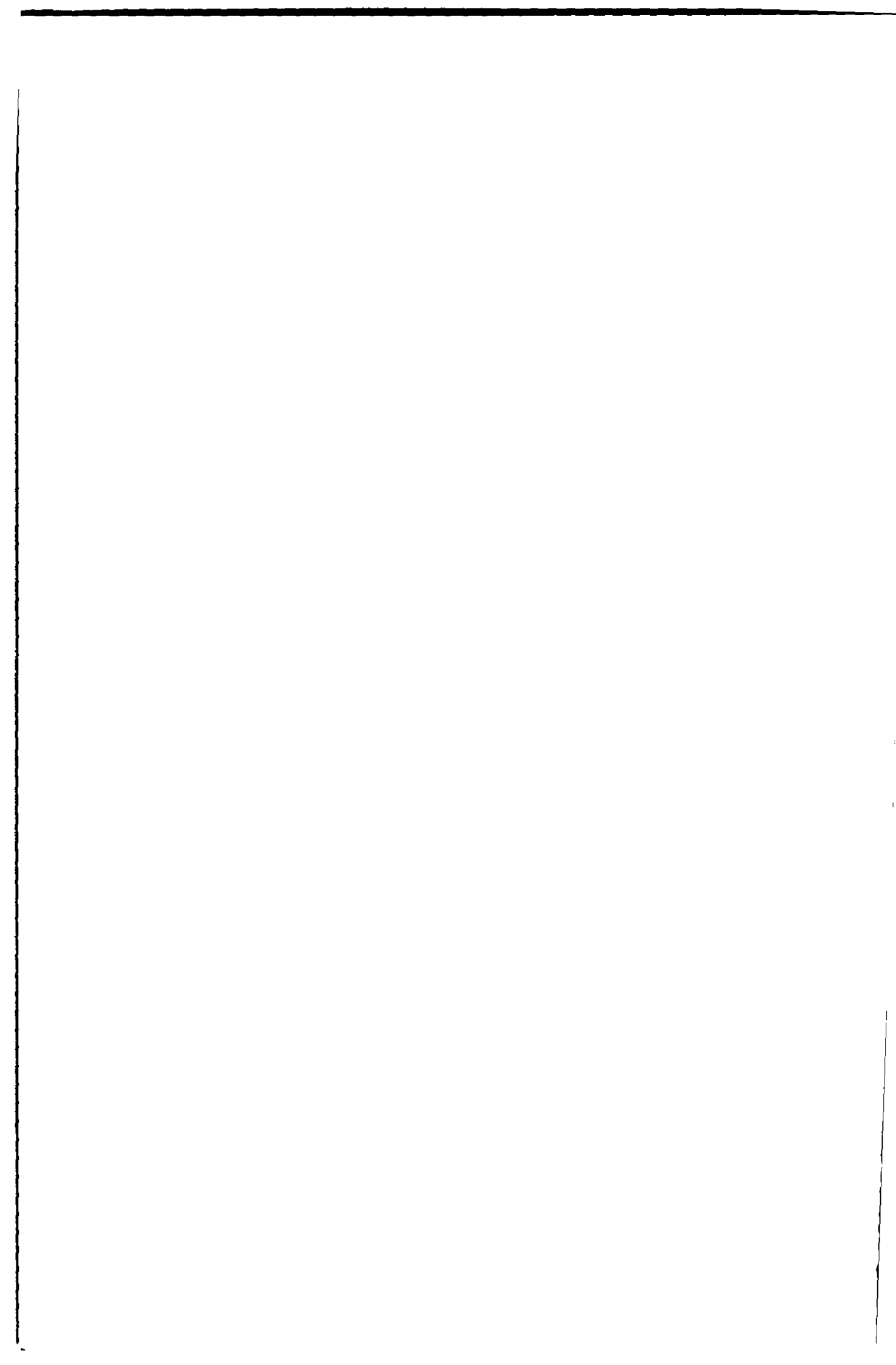
Zona pelusida mamalia merupakan lapisan glikoprotein ekstra seluler yang memegang peranan penting pada proses inisiasi interaksi antara sel spermatozoa dengan sel telur (Greenhouse *et al.*, 1999), selanjutnya menghasilkan fertilisasi (Tsubamoto *et al.*, 1999).

Hasil dari penelitian III ini ditunjang penelitian Hasegawa *et al.*(2001) yaitu : spermatozoa manusia (pasien kondisi parah, penyimpanan  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ditambahkan oosit manusia (penyimpanan beku) ditambahkan antiserum pengenceran 1: 200 ditambahkan FITC terkonjugasi dengan imunoglobulin kelinci, ternyata menghasilkan intensitas fluoresensi pada pemeriksaan mikroskop Ultra Violet

#### **6.4. Penelitian IV**

Hasil dari penelitian IV menunjukkan bahwa spermatozoa sapi tidak dapat mengikat antibodi I (antibodi anti ZP kambing), karena spermatozoa sapi tidak mempunyai reseptor terhadap antibodi I. Selanjutnya antibodi I tidak berikatan dengan Antibodi II. Kejadian ini dimanifestasikan pada pemeriksaan preparat natif, spermatozoa sapi tidak berfluoresensi.

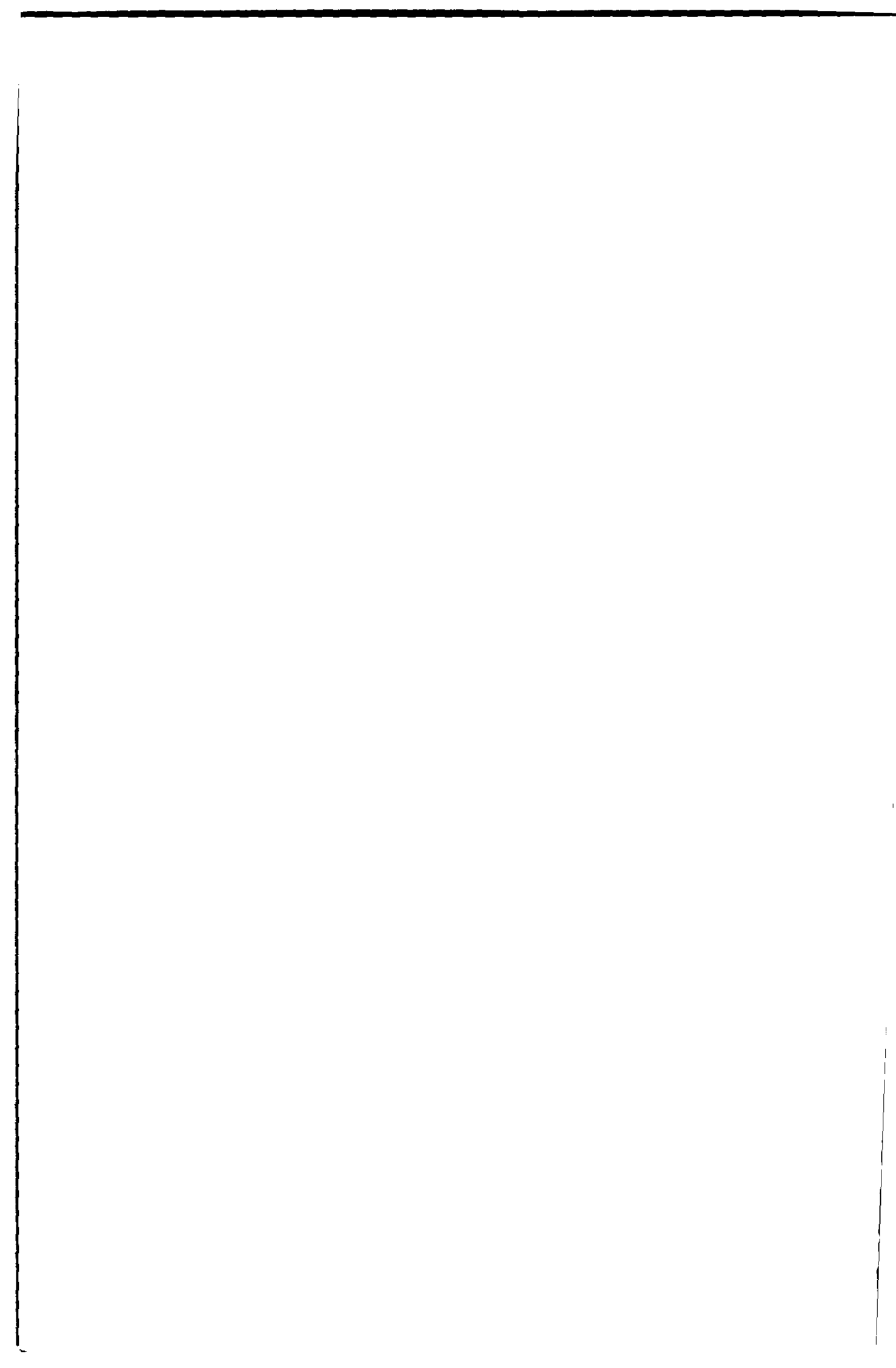
Penjelasan penelitian IV bahwa spermatozoa sapi tidak berikatan dengan antibodi I karena reseptor yang dimiliki spermatozoa sapi tidak sesuai dengan antibodi I, selanjutnya tidak mengikat ligand dari antibodi II dan akhirnya tidak terjadi binding.



### 6.5. Penelitian V

Pada penelitian V ini menunjukkan spermatozoa sapi tidak terikat/mengikat dengan homogenat ZP kambing, selanjutnya homogenat ZP kambing mengikat antibodi I dan antibodi I mengikat antibodi II yang telah dilabel FITC. Tahap akhir dari pembuatan preparat adalah pencucian dengan PBS + BSA 1 %, sehingga zat fluoresen tersebut akan luntur tercuci, dan preparat tidak menimbulkan sinar fluoresensi.

Kejadian pada penelitian V ini dimungkinkan karena spermatozoa sapi tidak dikenali oleh homogenat ZP kambing, dan tidak membentuk ikatan. Boleh dikatakan reseptor spermatozoa sapi tidak sesuai (tidak homolog) dengan reseptor pada ZP kambing.





## **BAB VII**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

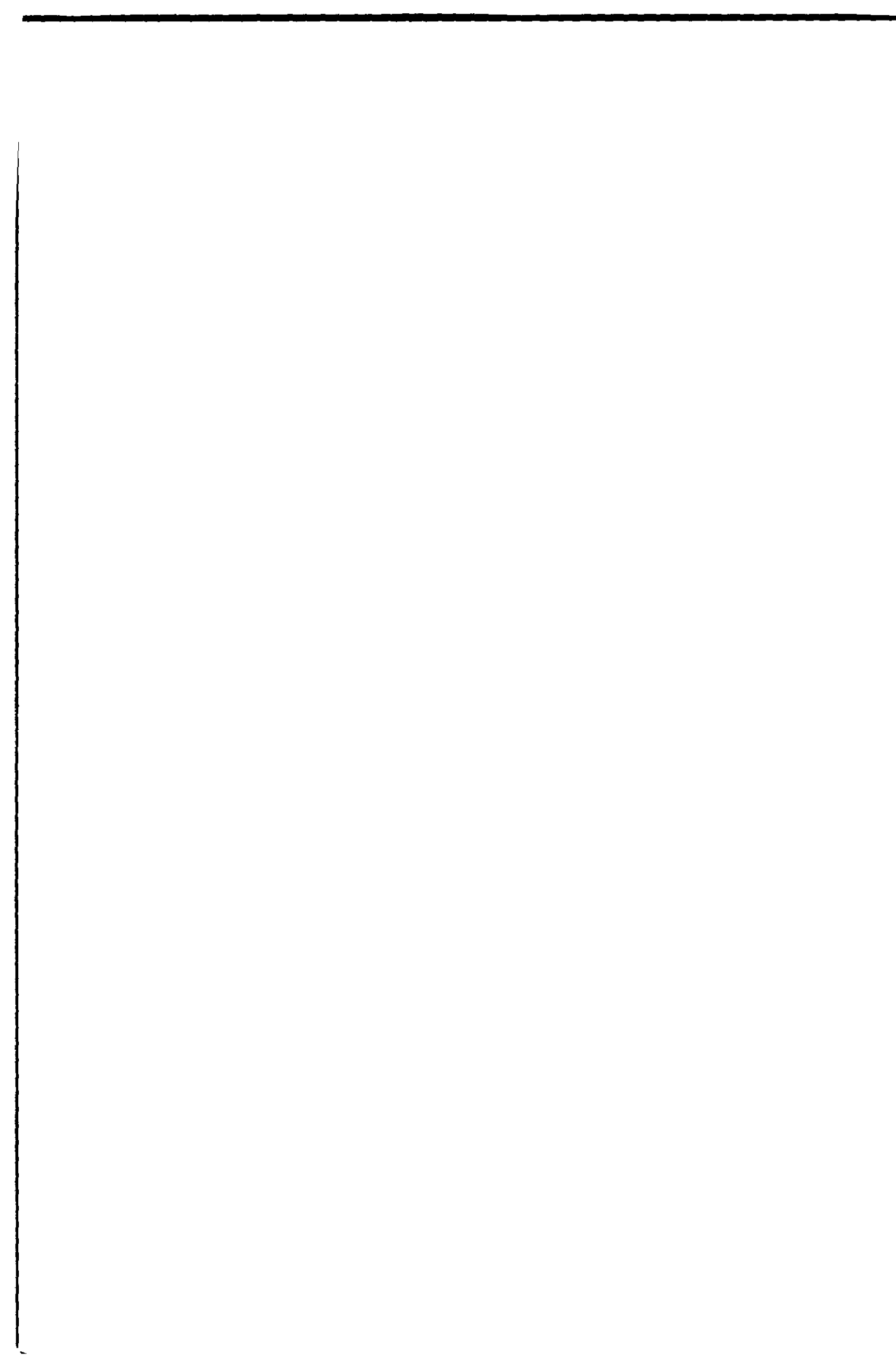
#### **7.1. Kesimpulan**

Penelitian ini menghasilkan kesimpulan sebagai berikut :

1. Uji imunofluoresensi natif dapat digunakan untuk mengenali spermatozoa kambing dengan homogenat zona pelusida kambing.
2. Uji imunofluoresensi natif spermatozoa sapi tidak dapat mengenali homogenat zona pelusida kambing.

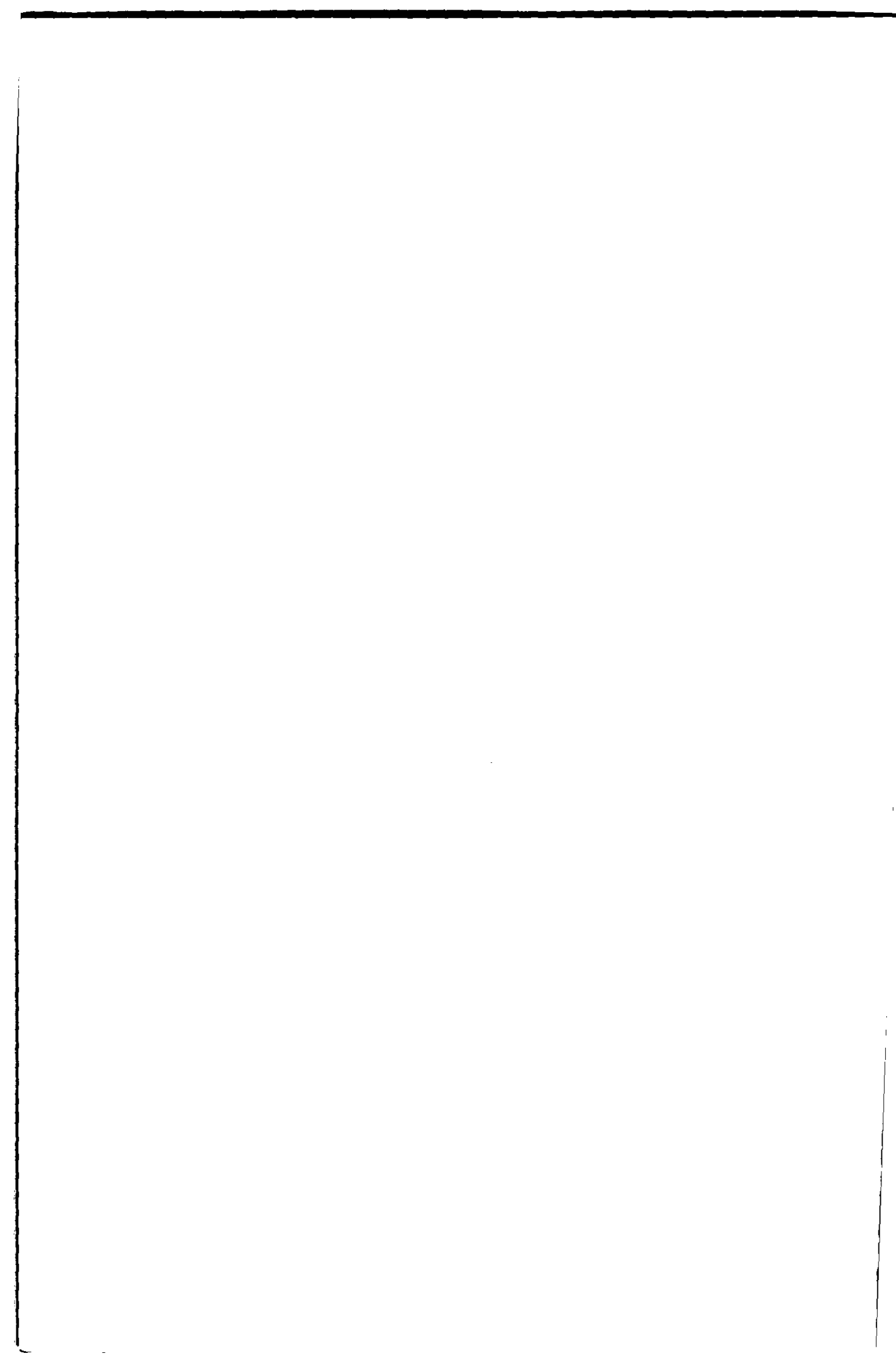
#### **7.2. Saran**

Penelitian ini perlu ditindaklanjuti dengan penelitian lanjutan pada hewan-hewan lainnya baik satu spesies atau antar spesies yang pada akhirnya mengarah ke manusia.

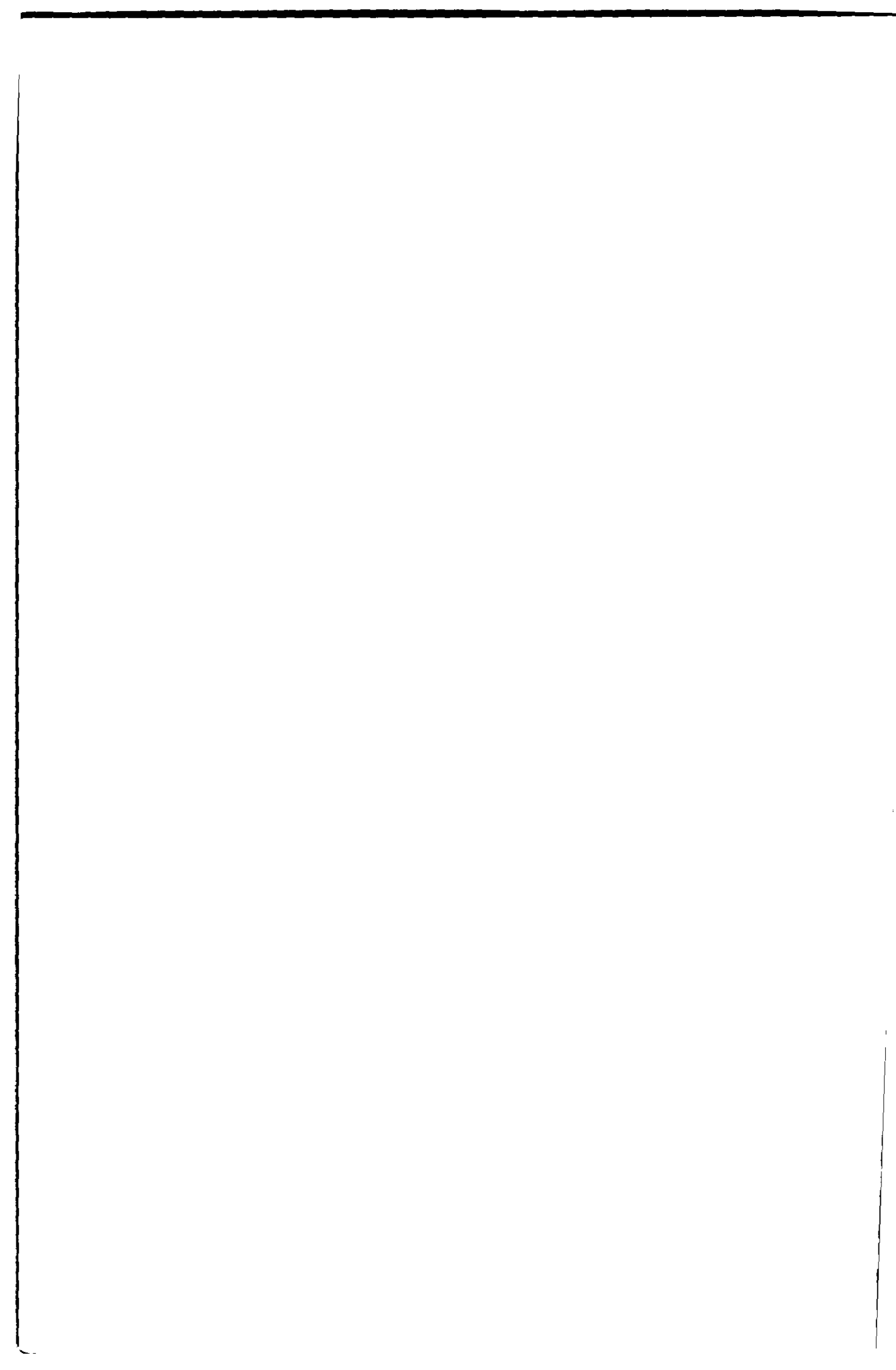


## DAFTAR PUSTAKA

- Aitken R.J., Peterson, M. and M. Van Dui. 1996. The potential of zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* 1996 Mar; 35(3): 175-180.
- Bazer, F.W., R.D. Geisert and M.T. Zavy. 2000. Fertilization, Cleavage and Implantation. In: Hafez, E.S.E. (Ed). *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Bradley, M.P., J. Eade, J. Penhale, J. Bird P.J. 1999 Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. *Biotechnol* 1999 Aug 20;73(2-3): 91-101.
- Epifano, O and J. Dean. 1994. Biology and structure of zona pellucida : a target for immunocontraception. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6(3): 319-30.
- Fayrer-Hosken, R.A., H.J. Bertschinger, J.F. Kirkpatrick, D. Grobler, N. Lamberski, G. Honneyman and T. Ulrich. 1999. Contraceptive potential of porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Theriogenology* 52(5): 835-846.
- Greenhouse, S, P.E. Castle and J. Dean. 1999. Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucida. *Hum Reprod* 1999 Mar; 14(3): 593-600.
- Gupta, S.K., P. Jethanandani, A. Afzalpurkar, R. Kaul and R. Santhanam. 1997. Prospects of zona pellucida glycoproteins as immunogens for contraceptive vaccine. *Hum Reprod Update*. 1997 Jul-Aug; 3(4): 311-24.
- Hasegawa, A., Y. Hamada, M. Shigeta and K. Koyama. 2001. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein. *J Reprod Immun* 53 (2002): 91-98.
- Istianah, F. 2000. Pengaruh penyuntikan suspensi oosit imatur kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah janin mencit (*Mus musculus*) betina. Skripsi. Universitas Airlangga.
- Jones, W.R. 1996. Contraceptive vaccines. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1996 Apr; 10(1): 69-86.
- Kaul, R., A. Afzalpurkar and S.A. Gupta. 1996. Strategies for designing an immunocontraceptive vaccine based on zona pellucida synthetic peptides and recombinant antigen. *J Reprod fertil Suppl* 1996; 50: 127-34.



- Kiefer, S.M. and P. Saling. 2002. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biology of Reproduction* 66: 407-414.
- Lee, E.B. and H.C. Chi. 1985. Female infertility evaluation of natural product. Proceeding from the UNESCO Regional Workshop. Seoul. November 1985. Pp: 18-22.
- Lindau-Shepard B., H.A. Brumberg, A.J. Peterson and J.A. Dias. 2001. Reversible immunoneutralization of human follitropin receptor. *J. Reprod Immunol* 2001 Jan; 49(1): 1-19.
- Martinez M.L. and J.D. Harris. 2000. Effectiveness of zona pellucida protein ZPB. as an immunocontraceptive antigen. *J. Reprod Fertil* 2000 Sep; 120(1): 19-32.
- McCartney C.A., K.E. Mate. 1999. Cloning and characterisation of a zona pellucida 3 cDNA from marsupial, the brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. *Zygote* 1999 Feb; 7(1): 1-9.
- Miller L.A., B.E. Johns, D.J. Elias and G.J. Killian. 1999. Oral vaccination of white-tailed deer using a recombinant *Bacillus Colmette-Guirin* vaccine expressing the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: prospects for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* 1999 Apr 41: 4 279-285.
- Mustofa I., L. Mahaputra dan S. Utama. 1999. identifikasi kinerja serum sapi FH dan kuda birahi dalam media maturasi oosit terhadap perkembangan sigot sapi Meduro. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga*. Vol. 7 No.2: 42-51.
- Mustofa, I., F. Istianah, D.S. Rinawati dan A. Kurniawati. 2001. Pengaruh vaksinasi Mencit (*Mus musculus*) betina terhadap angka kebuntingan, jumlah janin dan siklus birahi mencit dan gambaran histologis ovarium. *Unpublished Data*.
- Mulyati, S., I. Mustofa dan S. Utama. 2002. Pengaruh penyuntikan bahan aktif zona pelusida fraksi-3 kambing sebagai vaksin terhadap angka kebuntingan, jumlah janin dan siklus birahi mencit (*Mus musculus*). Laporan Penelitian Universitas Airlangga.
- Naz, R.K., A. Sacco, O. Singh, R. Pal and G.P. Talwar. 2000. Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotropin): current status. *Hum Reprod Update* 1995 Jan; 1(1): 1-18.
- Ndolo, T.M., M. Oguna, C.S. Bamba, B.S. Dunbar and E.D. Schwoebel. 1996. Immunogenicity of zona pellucida vaccines. *J Reprod Fertil Suppl* 1996; 50: 151-158.



- Peterson, M., M.R. Wilson, Z.A. Jennings, Van Duin M. and R.J. Aitken. 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in homologous primate model. *Mol Hum Reprod* 1999 Apr; 5(4): 342-352.
- Rahayu, L. 1988. Efek antifertilitas solanum mammosum pada mencit betina. Thesis. Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ranklin, T.R., M. O'Brien, E. Lee, K. Wigglesworth, J. Eppig, and J. Dean. 2001. Defective zonae pellucidae in ZP2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128; 1119-1126.
- Skinner, S.M., E.S. Schowobel, S.V. Prasad, M. Oguna, and B.S. Dunbar. 1999. Mapping of dominant B-cell epitopes of human zona pellucida protein (ZP1). *Biol Reprod* 1999 Dec; 61(6): 1373-1380.
- Thaler, C.D. and R.A. Cardullo. 1996. The initial molecular interaction between mouse sperm and the zona pellucida is a complex binding event. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 23289-23297.
- Thaler, C.D. and R.A. Cardullo. 2002. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. *Biology of Reproduction* 66: 65-69.
- Tsubamoto H, N. Yamasaki, A. Hasegawa and K. Koyama. 1999. Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 1999 Oct; 17(1): 8-15.
- Wodzicka-Tomaszewska, M., I.K. Utama, I.G. Putu dan T.D. Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkahlaku dan Produksi Ternak di Indonesia. P.T. Gramedia Pustaka Tama. Jakarta.
- Yurewicz, E.C., A.G. Sacco and M.G. Subramanian. 1986. Pathways to Immunocotra-ception : Biochemical and Immunological Properties of Glycoproteins of The Porcine Zona Pellucida. *Adv. Exp. Med. Biol.* 207 : 407-27.

- 1 MAR 2007

PAMERAN

MILIT  
PERPUSTAKA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

KK  
363.96  
Ide

Identifikasi reseptor fertilisasi  
pada homogenat membran ...  
Restiadi, Tjuk Imam

KKC

No. MHS.	NAMA PEMINJAM	Tgl. Kembali

*Handwritten signature*



