

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
TAHUN 2008



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PEMBAKUAN EPITOP PROTEIN MEMBRAN SPERMATOZOA  
KELINCI SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN  
IMUNOKONTRASEPSI PADA PRIA

Oleh :

Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.  
Prof. Dr. drh. Imam Mustofa, M.Kes.  
Dr. Dra. Alfiah Hayati, M.Kes.

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Nomor: 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal : 5 Maret 2008

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN 2008

LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING PERGURUAN TINGGI  
TAHUN 2008



KKC  
KK  
LP-232/10  
Wah

PEMBAKUAN EPITOP PROTEIN MEMBRAN SPERMATOZOA  
KELINCI SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN  
IMUNOKONTRASEPSI PADA PRIA P

Oleh :

Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.  
Prof. Dr. drh. Imam Mustofa, M.Kes.  
Dr. Dra. Alfiah Hayati, M.Kes.

DIBIYAI OLEH DIREKTORAT JENDERAL PENDIDIKAN TINGGI DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
Sesuai Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Nomor: 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008 Tanggal : 5 Maret 2008

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN 2008

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN TAHUNAN

### 1. Judul usulan :

Pembakuan epitop protein membran spermatozoa kelinci sebagai dasar pengembangan imunokontrasepsi pada pria

### 2. Ketua peneliti :

- a. Nama Lengkap : Dra. Sri Puji Astuti Wahyuningsih, M.Si.
- b. Jenis Kelamin : Perempuan (P)
- c. NIP : 131999645
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Jabatan Struktural : -
- f. Bidang Keahlian : Immunologi
- g. Fakultas/Departemen : Sains dan Teknologi/Biologi
- h. Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
- i. Tim Peneliti


NO	NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/ DEPARTEMEN	PERGURUAN TINGGI
1.	Prof. Dr. Imam Mustofa, M.Kes.	Biologi Reproduksi	Kedokteran Hewan	Universitas Airlangga
2.	Dra. Alfiah Hayati, M.Kes.	Kesehatan Reproduksi	FST/Biologi	Universitas Airlangga

### 3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian

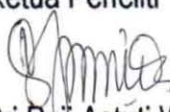
- a. Jangka Waktu Penelitian yang diusulkan : 3 tahun
- b. Biaya total yang diusulkan : Rp 120.000.000,-
- c. Biaya yang disetujui tahun 2007 dan 2008 : Rp 70.000.000,-

Surabaya, 9 Desember 2008

Mengetahui  
Dekan Fakultas FST UNAIR

  
Drs. Salamun, M.Kes.  
NIP.131696506

Ketua Peneliti

  
Dra. Sri Puji Astuti W., M.Si.  
NIP. 131999645

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Unair,

  
Prof. Dr. Bambang Sektiani Lukiswanto., DEA.drh.  
NIP. 131 837 004

## A. LAPORAN HASIL PENELITIAN

### PEMBAKUAN EPITOP PROTEIN MEMBRAN SPERMATOZOA KELINCI SEBAGAI DASAR PENGEMBANGAN IMUNOKONTRASEPSI PADA PRIA

Sri Puji Astuti Wahyuningsih<sup>1</sup>, Imam Mustofa<sup>2</sup>, Alfiah Hayati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, FST, Universitas Airlangga, Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Kampus C. Jl. Mulyorejo Surabaya

#### RINGKASAN

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan antibodi terhadap protein membran spermatozoa kelinci dalam menghambat fertilisasi yang diamati secara *in-vitro*. Penghambatan spermatozoa dilakukan secara *in-vivo* dan *in-vitro*.

Penelitian ini menggunakan kelinci jantan dan betina dewasa strain lokal. Spermatozoa dikoleksi kauda epididimis dengan cara *flushing*. Selanjutnya, protein membran spermatozoa diisolasi dalam larutan hipo-osmotik (10 mM *potassium phosphate buffer*) dengan teknik sentrifugasi. Penghambatan spermatozoa secara *in-vivo* dilakukan dengan cara kelinci jantan diimunisasikan dengan protein membran spermatozoa dosis 200 µg/µl. Imunisasi sebanyak 3 kali dengan selang waktu 21 hari. Titer antibodi diuji dengan ELISA. Spermatozoa dikoleksi, dihitung kecepatan motilitas dan morfologinya. Oosit dari kelinci superovulasi difertilisasi dengan. Penghambatan spermatozoa secara *in-vitro* dilakukan dengan cara kelinci betina dimunisasi dengan protein membran spermatozoa. Dosis dan cara imunisasi sama seperti di atas. Satu minggu setelah imunisasi ketiga dilakukan pengambilan serum. Serum digunakan untuk inkubasi spermatozoa. Selanjutnya, dilakukan uji fertilisasi spermatozoa terhadap oosit. Data berupa titer antibodi yang ditunjukkan dengan nilai OD dan persentase telur terfertilisasi karena penghambatan sperma *in-vitro* dianalisis anava dan dilanjutkan dengan uji LSD. Data motilitas dan morfologi sperma, serta persentase telur terfertilisasi karena penghambatan sperma *in-vivo* dianalisis dengan uji Kruskal Wallis.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi pre-imun lebih rendah dari imunisasi I, II, dan III dengan nilai OD berturut-turut 0,652, 1,490, 1,777, dan 1,853. Kecepatan motilitas spermatozoa perlakuan (10,284 µm/dt) lebih rendah kontrol (56,489 µm/dt). Spermatozoa dengan morfologi abnormal lebih banyak ditemukan pada perlakuan (67,3 %) daripada kontrol (14,74 %). Persentase telur yang terfertilisasi oleh sperma yang dihambat secara *in-vivo* pada perlakuan (5,33 %) lebih sedikit daripada kontrol (98 %). Persentase telur yang terfertilisasi oleh sperma yang dihambat berbagai konsentrasi antibodi 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5, dan 10 µg/ml berturut-turut adalah 98,33 %, 63,33 %, 33,33 %, 13,33 %, 6,67 %, dan 3,33 %.

Kesimpulan penelitian adalah lama waktu imunisasi berpengaruh pada titer antibodi, antibodi menurunkan motilitas dan menyebabkan morfologi spermatozoa abnormal, Spermatozoa yang telah dihambat dengan antibodi secara *in-vivo* dan *in-vitro* menurunkan kemampuan spermatozoa dalam membuahi sel telur melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*.

Kata Kunci : protein membran spermatozoa kelinci, epitop, imunokontrasepsi

# STANDARDIZED OF RABBIT SPERM MEMBRANE PROTEIN AS THE BASED OF DEVELOPING IMMUNOCOTRACEPTION IN MALE

Sri Puji Astuti Wahyuningsih<sup>1</sup>, Imam Mustofa<sup>2</sup>, Alfiah Hayati<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Department, Faculty of Science and Technology, Airlangga University, C Campus, Jl. Mulyorejo Surabaya

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary, Airlangga University, C Campus, Jl Muyorejo Surabaya

## SUMMARY

This research aim was to test the antibody ability on protein of membrane of spermatozoa rabbit in pursuing fertilization observed by in-vitro. Spermatozoa inhibition conducted by in-vivo and in-vitro.

This research used the adult female and male of local strain rabbit. Spermatozoa from rabbits were collected form the cauda epididymis by flushing. Hereinafter, membrane protein of rabbit spermatozoa was isolated in hypo-osmotic condensation (10 mM potassium phosphate buffer) with the technique centrifugation. Spermatozoa inhibition by in-vivo was conducted by the male rabbit was immunized with the membrane protein of spermatozoa dose 200 µg/µl. Immunizations done as much 3 times with a time gap of 21 days. Antibody titer tested by ELISA. Spermatozoa was collected and was calculated by their speed motility and morphology. Oocyte from rabbit super-ovulation was fertilized. Spermatozoa inhibition by in-vitro conducted by female rabbit immunized with the protein of membrane spermatozoa. Doses and technique in immunizing done in the same way as above. One week after third immunization conducted, serum was taken. Serum used for the spermatozoa incubation. Hereinafter, testing of spermatozoa on oocyte was conducted. Data in the form of titer antibody posed at with the value of OD and percentage of egg fertilized because of sperm inhibition by in-vitro then analyzed by Analysis of Variance technique and continued with the test of LSD. Data of motility and morphology of sperms, and percentage of fertilized eggs that caused in sperm inhibition by in-vivo was analyzed with the test of Kruskal-Wallis

Result of this research showed that titer antibody pre-immunization from was lower than I, II, and III immunizations with the value OD successively 0.652, 1.490, 1.777, and 1.853. The speed of motility spermatozoa group treatment (10.284 µm / sec) was lower than the control group (56,489 µm /sec). Spermatozoa with the abnormal morphology more amount found at treatment group (67.3 %) than control group (14.74 %). Egg percentage which fertilized with inhibited sperm in-vivo treatment (5,33 %) was less than the control group(98 %). Egg percentage which fertilized with inhibited in various antibody concentration 0; 0.625; 1.25; 2.5; 5, and 10 µg/ml, successively were 98.33 %, 63.33 %, 33.33 %, 13.33 %, 6.67 %, and 3.33 %.

Conclusion of this research conclusion show that length time of immunization influenced on the titer antibody, antibody reduced the motility and caused the abnormal on morphology spermatozoa. Spermatozoa which have been inhibited with the techniques of in-vivo and in-vitro antibody, could reduce the ability spermatozoa in fertilized of egg cell passing in-vitro observations

Key words: rabbit sperm membrane protein, epitope, immunocontraceptive

## PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT. atas berkat limpahan rahmat-Nya penelitian ini telah terlaksana walaupun belum sebagaimana penulis harapkan. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian ini. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Airlangga.
2. Pimpinan Fakultas Sains dan Teknologi (FST), Universitas Airlangga.
3. Ketua Departemen Biologi, FST, Universitas Airlangga.
4. Kepala Bagian Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
5. Kepala Institut of Tropical Disease (ITD), Universitas Airlangga
6. Staf Laboratorium Biokimia, FST, Universitas Airlangga.
7. Reny Retnowati dan Wahyu Inwaningsih, mahasiswa Program Studi Biologi, FST, Universitas Airlangga yang telah berperan serta dalam penelitian ini.
8. Rekan-rekan yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini yang belum penulis sebutkan satu persatu.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun demi kesempurnaan dari tulisan ini. Akhirnya, semoga karya penelitian ini dapat bermanfaat.

Surabaya, Desember 2008

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
<b>A. LAPORAN HASIL PENELITIAN</b>	
RINGKASAN dan SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR GAMBAR .....	viii
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	5
BAB III HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	16
BAB IV METODE PENELITIAN .....	18
BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....	29
BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....	47
DAFTAR PUSTAKA .....	48
<b>B. DRAF ARTIKEL ILMIAH .....</b>	<b>61</b>
<b>C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN .....</b>	<b>77</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Titer antibodi sebelum imunisasi (pre-imunisasi) .....	29
Tabel 5.2 Titer antibodi setelah imunisasi pertama .....	31
Tabel 5.3 Titer antibodi setelah imunisasi kedua .....	32
Tabel 5.4 Titer antibodi setelah imunisasi ketiga .....	34
Tabel 5.5 Rerata titer antibodi dan pengenceran pada saat per-imunisasi, setelah imunisasi pertama, kedua, ketiga .....	35
Tabel 5.6 Kecepatan motilitas spermatozoa ( $\mu\text{m}/\text{detik}$ ) kelinci kontrol dan Perlakuan .....	37
Tabel 5.7 Persentase morfologi spermatozoa normal (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan .....	38
Tabel 5.8 Persentase morfologi spermatozoa abnormal (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan .....	39
Tabel 5.9 Persentase oosit terfertilisasi dan tidak terfertilisasi (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan .....	41
Tabel 5.10 Titer antibodi setelah imunisasi I, II, dan III pada kelinci betina .....	43
Tabel 5.11 Konsentrasi antibodi setelah imunisasi III pada kelinci betina .....	45
Tabel 5.12 Pengaruh konsentrasi antibodi pada fertilisasi kelinci kontrol dan perlakuan .....	46



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Spermatozoa kelinci .....	6
Gambar 2.2 Skema ultrastruktur spermatozoa .....	7
Gambar 2.3 Membran plasma spermatozoa .....	9
Gambar 2.4 Skema representatif letak protein testis dan epididimis pada kepala spermatozoa epididimis manusia .....	11
Gambar 4.1 Bagan alir penelitian tahun kedua .....	18
Gambar 5.1 Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi yang diuji dengan metode ELISA .....	30
Gambar 5.2 Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi pada berbagai pengenceran .....	30
Gambar 5.3 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi I yang diuji dengan metode ELISA .....	31
Gambar 5.4 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi pertama pada berbagai pengenceran .....	32
Gambar 5.5 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi II yang diuji dengan metode ELISA .....	33
Gambar 5.6 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi kedua pada berbagai pengenceran .....	33
Gambar 5.7 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi III yang diuji dengan metode ELISA .....	34
Gambar 5.8 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi ketiga pada berbagai pengenceran .....	35
Gambar 5.9 Morfologi spermatozoa normal dan abnormal .....	39
Gambar 5.10 Morfologi spermatozoa normal dan abnormal .....	40
Gambar 5.11 Oosit yang terfertilisasi dan oosit yang sudah terfertilisasi .....	42
Gambar 5.12 Oosit yang terfertilisasi membentuk <i>polar body</i> II .....	42
Gambar 5.13 Titer antibodi kelinci betina 1 (P-1) setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran .....	43
Gambar 5.14 Titer antibodi kelinci betina 2 (P-2) setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran .....	44
Gambar 5.15 Titer antibodi kelinci betina setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran .....	44

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Kelinci jantan yang digunakan dalam penelitian .....	53
Lampiran 2. Analisis statistik titer antibodi .....	54
Lampiran 3. Analisis statistik kecepatan motilitas spermatozoa .....	56
Lampiran 4. Analisis statistik morfologi spermatozoa normal .....	57
Lampiran 5. Analisis statistik telur terfertilisasi pada penghambatan sperma <i>in-vivo</i> .....	58
Lampiran 6. Analisis statistik telur terfertilisasi pada penghambatan sperma <i>in-vitro</i> .....	59

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Rata-rata pertumbuhan populasi penduduk dunia sekarang hingga tahun 2050 diperkirakan dapat mencapai 8,9 milyar. Hal ini dapat menimbulkan resiko terjadinya overpopulasi (Suri, 2005). Pertambahan penduduk di Indonesia juga meningkat secara tajam dari tahun ke tahun. Akhir tahun 2004 diketahui jumlah penduduk Indonesia telah mencapai 220 juta jiwa (Anonimus, 2005). Pengendalian penduduk dengan menggunakan alat kontrasepsi dapat menunda kehamilan, menjarangkan, mengatur jumlah anak, dan menghentikan kehamilan. Di Indonesia, pengendalian penduduk di laksanakan dalam suatu Program Keluarga Berencana (KB).

Di Indonesia, program KB yang ditujukan untuk kaum pria masih jarang. Menurut Anonimus (2006), peserta KB pria baru mencapai 1,3% dari total 58,3% dari seluruh peserta KB. Metode kontrasepsi pria yang telah dilakukan selama ini hanya ada 2 macam, yaitu penggunaan kondom dan vasektomi. Menurut Anonimus (2008), kondom efektif mencegah kehamilan 75 – 80% dan mempunyai kekurangan, yaitu mudah robek bila terkena kuku atau benda tajam, membutuhkan waktu untuk pemasangan, dan mengurangi sensasi seksual. Sedangkan vasektomi efektif mencegah kehamilan secara permanen.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut diperlukan strategi kontraseptif yang baru (Suri, 2005). Imunokontrasepsi merupakan alternatif kontrasepsi dengan prinsip imunologis yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigenik dan bertujuan untuk mencegah pertemuan antara spermatozoa dan

# **BAB I PENDAHULUAN**

## **1.1. Latar Belakang Permasalahan**

Rata-rata pertumbuhan populasi penduduk dunia sekarang hingga tahun 2050 diperkirakan dapat mencapai 8,9 milyar. Hal ini dapat menimbulkan resiko terjadinya overpopulasi (Suri, 2005). Pertambahan penduduk di Indonesia juga meningkat secara tajam dari tahun ke tahun. Akhir tahun 2004 diketahui jumlah penduduk Indonesia telah mencapai 220 juta jiwa (Anonimus, 2005). Pengendalian penduduk dengan menggunakan alat kontrasepsi dapat menunda kehamilan, menjarangkan, mengatur jumlah anak, dan menghentikan kehamilan. Di Indonesia, pengendalian penduduk di laksanakan dalam suatu Program Keluarga Berencana (KB).

Di Indonesia, program KB yang ditujukan untuk kaum pria masih jarang. Menurut Anonimus (2006), peserta KB pria baru mencapai 1,3% dari total 58,3% dari seluruh peserta KB. Metode kontrasepsi pria yang telah dilakukan selama ini hanya ada 2 macam, yaitu penggunaan kondom dan vasektomi. Menurut Anonimus (2008), kondom efektif mencegah kehamilan 75 – 80% dan mempunyai kekurangan, yaitu mudah robek bila terkena kuku atau benda tajam, membutuhkan waktu untuk pemasangan, dan mengurangi sensasi seksual. Sedangkan vasektomi efektif mencegah kehamilan secara permanen.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut diperlukan strategi kontraseptif yang baru (Suri, 2005). Imunokontrasepsi merupakan alternatif kontrasepsi dengan prinsip imunologis yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigenik dan bertujuan untuk mencegah pertemuan antara spermatozoa dan

ovum (Hamamah *et al.*, 1997). Vaksin imunokontrasepsi dapat mengganggu aktivitas reproduksi pria maupun wanita dengan cara memblok penetrasi spermatozoa pada ovum atau mencegah implantasi dan perkembangan telur terfertilisasi (Alexander dan Bialy, 1994).

Sekarang ini banyak dipelajari sifat antigenisitas protein spermatozoa sebagai dasar pengembangan vaksin kontrasepsi (Primakoff *et al.*, 1997). Penggunaan antigen sperma untuk pengembangan vaksin kontrasepsi ditekankan pada spesifitas sperma (hanya bekerja pada gamet), peran pada fertilitas, imunogenisitas yang meliputi pembentukan respon antibodi yang cukup dan mampu menghalangi fertilitas (Naz, 1996). Antigen sperma cukup berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin kontrasepsi dalam imunokontrasespsi baik imunisasi pada hewan jantan maupun betina (Naz dan Vanek, 1998).

Membran spermatozoa mengandung protein yang bersifat sebagai antigen. Imunisasi dengan protein membran spermatozoa akan menimbulkan respon imun spesifik dan terbentuk antibodi terhadap protein membran spermatozoa. Reaksi antara antibodi dengan antigen menimbulkan efek konsepsi, seperti aglutinasi spermatozoa, reduksi motilitas, gangguan penetrasi mukus servik, tidak efisiennya fusi spermatozoa dan telur, peningkatan fagositosis spermatozoa dan matinya embrio pre atau pasca implantasi. Semua hambatan tersebut menyebabkan antifertilitas. Menurut Yatim (1994), antigen protein membran spermatozoa berpotensi untuk dikembangkan menjadi vaksin kontrasepsi yang aman, tidak mempunyai pengaruh negatif, murah, mempunyai pengaruh yang tidak permanen, dan mudah menggunakannya.

Antibodi terhadap spermatozoa (*antisperm antibody/ASA*) menyebabkan infertil baik secara spontan maupun buatan (Bohring *et al.*, 2001). *Antisperm antibody* dapat mempengaruhi stadium pre-fertilisasi dan dapat menghambat perkembangan zigot setelah fertilisasi (Domagala dan Kurpisz, 2004). Menurut Bohring *et al.*, (2001), antibodi terhadap antigen spermatozoa dapat dideteksi pada cairan/plasma seminal dan mereka dapat berikatan pada permukaan spermatozoa. *Antisperm antibody* juga dapat dideteksi pada mukus servik, cairan oviduk atau cairan folikel pada wanita. *Antisperm antibody* juga berada dalam serum darah pada wanita dan pria. Menurut Bohring dan Krause (2003), timbulnya ASA pada pria dapat menyebabkan infertilitas.

Naz (1996) menyatakan bahwa imunisasi aktif dengan antigen *lactate dehydrogenase (LDH)-C4* yang diisolasi dari spermatozoa manusia menyebabkan reduksi fertilitas lebih dari 50% pada berbagai spesies. Aktif imunisasi dengan protein *rabbit sperm autoantigen (RSA) family* bereaksi silang dengan sperma manusia dan menghambat penetrasi sperma pada oosit. Penelitian Wahyuningsih (2005) menyatakan bahwa ekstrak testis yang mengandung protein spesifik testis yang diimunisasikan pada mencit betina menurunkan angka kebuntingan, terutama pada dosis antigen ekstrak testis 2000  $\mu\text{g}$ . Beberapa peneliti menyatakan bahwa pada membran sel spermatozoa terdapat protein 32, 34, 35, 36, 50, 53, 56, dan 57 kDa yang berpartisipasi pada proses fertilisasi.

Menurut Anonimus<sup>a</sup> (2007), beberapa sekuen protein sperma spermatozoa kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang telah diketahui urutannya adalah *sperm membrane protein*, *acrosomal vesicle protein 1*, *sperm surface protein Sp17*, *hyaluronidase PH-20 precursor (64 kDa)*, *sperm membrane protein-B*, *A disintegrin* and

*metalloproteinase domain 2 precursor (fertilin subunit beta/PH-30), zonadhesin (55-57 kDa), fertilin alpha subunit, acrosin (46 kDa).*

Berdasarkan dari latar belakang di atas, maka penelitian ini ingin mengetahui potensi protein membran spermatozoa kelinci sebagai dasar pengembangan imunokontrasepsi. Hasil penelitian diharapkan menjadi dasar pembuatan vaksin kontrasepsi terutama vaksin rekombinan yang relatif aman untuk digunakan dalam kontrasepsi masa depan.

## 1.2. Rumusan Masalah

Masalah yang ingin dijawab dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a) Apakah lama waktu imunisasi mempengaruhi titer antibodi terhadap spermatozoa pada kelinci jantan?
- b) Apakah antibodi terhadap spermatozoa mampu menghambat motilitas dan mempengaruhi morfologi spermatozoa ?
- c) Apakah spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vivo* mampu membuahi oosit melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*?
- d) Apakah spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vitro* mampu membuahi oosit melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*?

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Spermatozoa

Morfologi spermatozoa merupakan salah satu parameter yang penting untuk mendeterminasi kualitas sperma. Menurut Hafez (2000), tipe spermatozoa adalah sel *stripped down* terdiri atas kepala, leher serta ekor. Ekor dilengkapi dengan flagel yang kuat sebagai penggerak melalui medium cair. Spermatozoa tidak memiliki organel seperti ribosom, retikulum endoplasma, dan badan golgi, tetapi memiliki banyak mitokondria sebagai penyedia energi.

Pada bagian kepala terdiri atas sel berinti padat dengan sedikit sitoplasma dan lapisan membran sel di sekitar permukaannya. Bagian kepala didominasi oleh inti sel haploid yang mengandung materi genetik (DNA dan RNA). Dua pertiga bagian depan sel ditutupi oleh akrosom. Akrosom merupakan vesikel sekretori yang terletak pada bagian anterior membran inti. Membran luar akrosom dilindungi oleh membran plasma dan bergabung dengan membran dalam akrosom bagian posterior. Antara membran plasma dan membran dalam akrosom terdapat matrik akrosomal. Matrik tersebut terdiri dari dua enzim hidrolitik yaitu hyaluronidase dan akrosin. Kedua enzim tersebut berperan dalam penetrasi spermatozoa ke membran sel telur (Grudzinskas dan Yovich, 1995). Hyaluronidase berfungsi untuk melisiskan korona radiata sedangkan enzim proteolitik yang terdapat pada akrosin berfungsi untuk mencerna protein membran sel telur (Guyton dan Hall, 1997). Kepala spermatozoa bagian posterior mengandung sejumlah besar mitokondria (Campbell *et al.*, 2004). Mitokondria berperan dalam pembentukan adenosin trifosfat (ATP), yang merupakan sumber energi untuk aktifitas spermatozoa (Isnaeni, 2006).

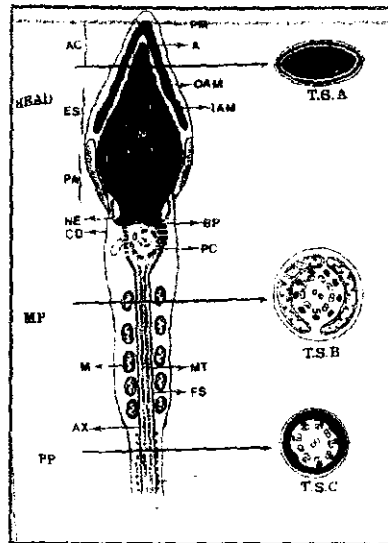


Bagian leher merupakan persambungan antara kepala dan ekor. Pada tempat ini terdapat sentriol dan tersusun oleh fibril pusat dan fibril perifer yang berfungsi untuk kontraksi dan pergerakan. Pada bagian ini banyak mengandung lemak berupa lipoprotein dan sitokrom untuk pernapasan (Guyton dan Hall,1997). Tempat melekat ekor ke kepala spermatozoa disebut *implantation fossa*, dan bagian ekor yang menonjol disebut *capitulum*, semacam sendi peluru pada kepala (Yatim, 1994).

Ekor spermatozoa terdiri dari bagian tengah (*middle piece*), bagian utama (*principle piece*) dan bagian akhir (*end piece*) (Bouchard et al., 2000). Pada bagian *middle piece* tersusun oleh membran sel, mitokondria dan serabut tebal. Di bagian dalam serabut tebal terdapat *axonema* yang terdiri dari 9 pasang mikrotubulus yang dihubungkan dengan *dynein arm* dan *radial spoke* serta satu pasang mikrotubulus di bagian tengah. Pada bagian *principle piece* tersusun oleh membran sel yang menyelubungi 7 serabut fibrosa dan *axonema*. Sedangkan bagian *end piece* tersusun oleh membran sel dan *axonema* (Gambar 2.1 dan Gambar 2.2).



Gambar 2.1 Spermatozoa kelinci (<http://faculty.sulross.edu/img0092.jpg>)



Gambar 2.2 Skema ultrastruktur spermatozoa. PM = membran plasma, A = akrosom, OAM = membran akrosom luar, IAM = membran akrosom dalam, BP = *basal plate*, PC = sentriol proksimal, MT = mikrotubulus, FS = serabut tebal, M = mitokondria, AX = aksonema, NE = selubung inti, AC = tudung akrosom, ES = akrosom bagian ekuatorial, MP = *middle piece*, PP = *principle piece* (Hayati, 2007).

Spermatozoa pada tubulus seminiferus dan bagian awal/kaput epididimis ialah spermatozoa yang tidak motil dan tidak dapat membuahi ovum. Setelah spermatozoa berada dalam epididimis selama 18 – 24 jam, maka spermatozoa memiliki kemampuan motilitas walaupun beberapa faktor penghambat protein dalam cairan epididimis masih mencegah motilitas. Motilitas spermatozoa terjadi setelah ejakulasi (Guyton dan Hall, 1997).

## 2.2. Membran Spermatozoa

Penyusun membran sel pada umumnya adalah lipid, glikolipid dan glikoprotein. Tebal membran sel berkisar 6-10 nm. Membran lipid bersifat hidrofilik dan hidrofobik yang membentuk dua lapis (*bilayer*) lipid (Gaudreault et al., 2001).

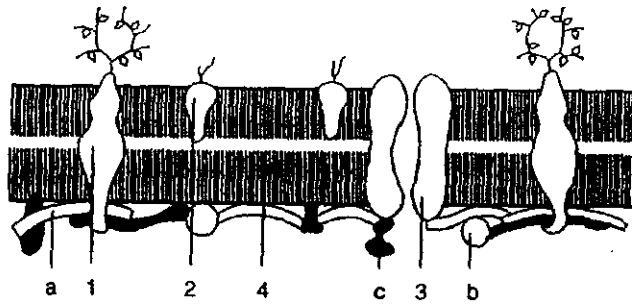
Membran sel berfungsi sebagai selaput untuk setiap sel dan juga menyelaputi banyak organel dalam sel. Lapisan ini tersusun atas dua lapis lemak dan ditunjang oleh

banyak molekul protein. Banyak di antara protein membran itu yang bertindak sebagai penerima atau reseptor bagi berbagai zat untuk bisa dibawa masuk ke dalam sel (Siswono, 2001).

Membran spermatozoa berfungsi untuk menyelubungi bagian luar sel mulai dari bagian kepala sampai ekor. Pada siklus hidup spermatozoa, membran ini berfungsi untuk pendewasaan, motilitas, reaksi akrosom spermatozoa, dan interaksi spermatozoa-sel telur. Membran sel dibagian kepala bagian depan (anterior) adalah bagian yang stabil untuk reaksi akrosom. Bagian ini mengandung *choline phospholipid* yang terdiri dari gliserol (gliserolipid) dan banyak rantai asam lemak tidak jenuh (Reisse *et al.*, 2001).

Komponen lipid membran spermatozoa merupakan derivat dari spermatogonia. Komponen tersebut disintesis di sel germinal dan sel sertoli serta dikendalikan oleh hormon. Struktur membran secara lengkap terjadi saat spermatozoa menuju ke epididimis. Kelenturan membran dan kandungan asam lemak tidak jenuh dan plasmalogen meningkat ketika spermatozoa meninggalkan testis menuju ke epididimis melalui bagian kaput dan korpus menuju kauda (Lenzi *et al.*, 2000; Reisse *et al.*, 2001). Selama proses pendewasaan ini, spermatozoa banyak kehilangan sitoplasma, dan asam lemak pada membran sel. Perubahan profil antigen membran sel terutama terjadi pada kandungan glikoprotein (Zanich, *et al.*, 2003).

Terdapat tiga macam protein yang terdapat pada membran spermatozoa berdasarkan letak protein pada membran sel. Macam protein tersebut adalah : 1) non-motil lipoprotein dengan rantai oligosakarida; 2) protein transmembran; 3) motil lipoprotein (Hafez and Hafez, 2005) (Gambar 2.3).



Gambar 2.3 Membran plasma spermatozoa. (1) non-motil lipoprotein dengan rantai oligosakarida; (2) motil lipoprotein; (3) protein transmembran; (4) bilayer lipid; (a) spectrin; (b) actin; (c) binding protein (Hafez and Hafez, 2005).

Membran spermatozoa mengalami perubahan substansial selama meninggalkan testis menuju ke epididimis. Perubahan tersebut terjadi karena adanya pertukaran komposisi fosfolipid membran dan pertukaran protein dengan protein yang berada di epididimis (Hayati, 2007). Epididimis sebagai tempat pendewasaan spermatozoa, menyediakan berbagai protein untuk kebutuhan spermatozoa di dalam seminalnya. Protein tersebut berasal dari sekresi tubulus seminiferus dan sel epitelium epididimis (Hess, 2000).

### 2.3 Protein Membran Spermatozoa

Protein transmembran merupakan salah satu contoh protein reseptor yang berada dan beroperasi di dalam membran plasma. Protein transmembran berperan dalam komunikasi seluler dan sinyal transduksi (Anonimus<sup>b</sup>, 2007). Protein transmembran juga terlibat dalam proses penggabungan membran spermatozoa dengan zona pelusida sel telur dan berperan sebagai reseptor. Reseptor tersebut berfungsi untuk pengenalan protein membran spermatozoa dengan zona pelusida sel telur pada proses fertilisasi. Penelitian protein spesifik pada spermatozoa telah

dilakukan pada beberapa spesies seperti mencit, tikus, dan babi (Naz, 1996; Hayati, 2007).

Menurut Sacco dan Shivers (1978), ada 2 pendekatan untuk memproduksi heteroantibodi terhadap antigen spesifik jaringan reproduksi. Pertama, produksi antiserum terhadap protein murni atau glikoprotein yang spesifik terhadap jaringan reproduksi. Misalnya, antigen spesifik pada jantan adalah *sperm hyaluronidase*, *lactate dehydrogenase-X* (LDH-X) dan *acrosin*. Sedangkan, antigen spesifik pada betina adalah  $\beta$ -HCG dan protein plasenta SP<sub>1</sub>. Kedua, produksi heteroantiserum terhadap jaringan reproduksi dalam tubuh hewan (ovari, uterus dan testis).

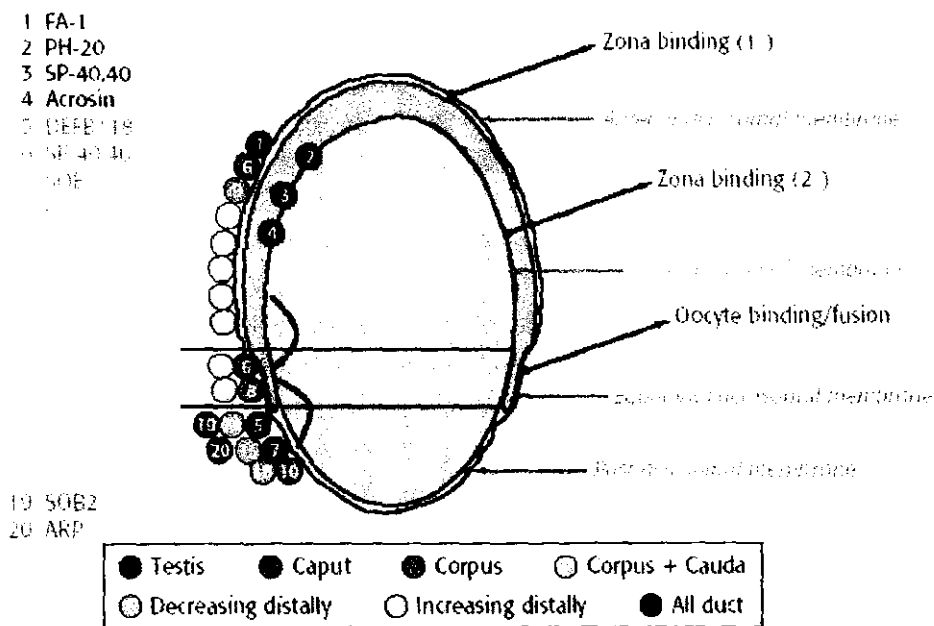
Griffin dan Jones (1991) menyatakan bahwa ada 2 tipe antigen sperma, yaitu antigen fungsional dan antigen struktural. Antigen fungsional meliputi enzim yang diperlukan untuk metabolisme sperma, seperti LDH-X atau LDH-C4 atau terlibat dalam interaksi sperma-telur dan pengarah proses fertilisasi, seperti *acrosine* dan *hyaluronidase*. Antigen struktural seperti molekul yang diekspresi dalam membran sel sperma dan terlibat dalam interaksi gamet dan fusi.

Menurut Alexander dan Anderson (1987), antigen harus diekspresikan pada membran sel sperma untuk dapat menimbulkan antibodi. Naz (1996) menyatakan bahwa sejumlah antigen yang dikarakterisasi dari permukaan sperma, yaitu LDH-C4 (140 kD, ada 4 sub-unit masing-masing 35 kD), RSA-family ( $13 \pm 2$  kD), SP 10 (18 - 34 kD), HSA-63 (ada 3 protein, 50, 43, dan 42 kD), FA 1 (monomer 23 kD dan dimer  $51 \pm 2$  kD), FA 2 (95 kD) dan CS-1 (14 dan 18 kD).

Menurut Anonimus<sup>a</sup> (2007), beberapa sekuen protein sperma spermatozoa kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang telah diketahui urutannya adalah *sperm*

membrane protein, acrosomal vesicle protein 1, sperm surface protein Sp17, hyaluronidase PH-20 precursor (64 kDa), sperm membrane protein-B, A disintegrin and metalloproteinase domain 2 precursor (fertilin subunit beta/PH-30), zonadhesin (55-57 kDa), fertilin alpha subunit, acrosin (46 kDa).

Protein-protein membran spermatozoa berperan dalam zona binding dan atau oocyte binding/fusion. Protein membran disintesis mulai dari testis sampai epididimis. Skema representatif letak protein testis dan epididimis pada kepala spermatozoa epididimis manusia dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Skema representatif letak protein testis dan epididimis pada kepala spermatozoa epididimis manusia (Cooper dan Yeung, 2006)

Pada spermatozoa babi, interaksi sperma-telur diperankan oleh protein zonadhesin. Pada testis tikus, zonadhesin juga ditemukan, yaitu pada transmembran bagian apikal kepala spermatozoa (Gao and Garbers, 1998). Beberapa protein membran spermatozoa yang telah ditemukan antara lain protein mannosidase, protein 29 kDa, dan protease (pada tikus); dan protein 32, 34, dan 57 kDa (pada manusia)

(Gao and Garbers, 1998; Hao *et al.*, 2002; Luconi *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 1998; Rajeev dan Reddy, 2004). Selain itu pada tonjolan di bagian kepala juga ditemukan protein dengan berat 15, 34, dan 57 kDa. Protein tersebut berpartisipasi pada proses fertilisasi khususnya pada saat *sperm/zona binding* (Breed *et al.*, 2000).

Menurut Wahyuningsih *et al.* (2004), imunisasi dengan ekstrak testis yang mengandung protein spesifik testis pada mencit menurunkan jumlah anak pada mencit, tetapi tidak menurunkan jumlah implantasi. Wahyuningsih (2005) juga menyatakan bahwa imunisasi juga menurunkan angka kebuntingan. Wahyuningsih (2006) menyatakan juga bahwa imunisasi tidak menimbulkan gangguan pada siklus birahi.

Naz dan Vanek (1998) menyatakan bahwa antigen sperma sangat menarik untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin kontrasepsi dalam imunokontrasepsi baik imunisasi pada hewan jantan maupun betina. Selanjutnya, beberapa peneliti mengisolasi protein spermatozoa dan dicobakan untuk diimunisasikan terhadap beberapa binatang. Hasil yang didapat, protein membran sperma/spermatozoa bersifat antigenik sehingga imunisasi dengan protein sperma akan menimbulkan *antisperm antibody* (ASA). Tetapi tidak semua dari protein tersebut menyebabkan antifertilitas. Menurut Domagala dan Kurpisz (2004), seleksi terhadap antigen sperma untuk pengembangan vaksin kontrasepsi lebih ditekankan pada spesifitas, partisipasinya dalam proses fertilisasi dan berpotensi untuk menginduksi titer antibodi spesifik sperma yang tinggi dalam saluran reproduksi.

### **2.3. Pembentukan Antibodi**

Pada tubuh manusia dan hewan terdapat suatu sistem pertahanan terhadap substansi asing yang berbahaya bagi dirinya. Sistem pertahanan tersebut dikenal

dengan respon imun. Ada dua macam respon imun, yaitu respon imun non-spesifik dan respon imun spesifik (Bellanti, 1993). Respon imun spesifik dilakukan dengan 2 macam cara, yaitu respon imun humoral dan respon imun seluler. Pada respon imun humoral melibatkan produksi antibodi. Mekanisme kerja antibodi dalam mempertahankan tubuh terhadap bahan asing atau antigen melalui dua cara, yaitu secara langsung menyerang antigen dan secara tidak langsung mengaktifkan sistem komplemen yang akan merusak antigen (Guyton, 1995).

Naz (1996) menyatakan bahwa produksi respon imun terhadap antigen tergantung dalam suatu jalur, meliputi pengiriman antigen pada sel limfoid, aktivasi *antigen presenting cell* (APC), pengenalan kompleks *Ag-major histocompatibility* (MHC) oleh limfosit T, pengikatan epitop antigen pada reseptor limfosit, dan internalisasi produksi sitokin oleh APC, sel T dan sel B yang dibutuhkan untuk memproduksi antibodi dan atau sel sitotoksis.

Protein membran spermatozoa yang bersifat antigen dapat mengaktifkan respons imun spesifik untuk membentuk antibodi terhadap protein membran spermatozoa. Respon imun spesifik dimulai dengan aktivitas makrofag atau *antigen presenting cells* (APC) yang memproses antigen sehingga dapat menimbulkan interaksi dengan sel-sel sistem imun spesifik. Antigen yang telah diproses oleh APC membentuk kompleks ikatan dengan molekul *major hiscompatibility kompleks II* (MHC II). Sel T *helper*, dapat mengenali kompleks Ag-MHC II pada permukaan sel APC melalui reseptor sel T, sehingga mengaktifasi sel T untuk memproduksi sitokin atau limfokin (Nossal, 1993). Adanya sitokin atau limfokin menyebabkan interaksi sel T *helper* dengan sel B sehingga sel B berdiferensiasi menjadi sel plasma yang menghasilkan



antibodi dan sel memori (Austyn dan Wood, 1994; Goldsby *et al.*, 2000; Hercowitz, 1993). Sedikitnya antigen harus mempunyai dua determinan atau epitop, untuk merangsang pembentukan antibodi, sedangkan untuk merangsang limfosit T dibutuhkan sedikitnya satu determinan (Kresno, 2001).

#### **2.4. Fertilisasi dan Antifertilitas**

Fertilisasi adalah proses kompleks yang memerlukan spermatozoa untuk menembus dan mengadakan fusi dengan membran plasma telur (Naz dan Vanek, 1998). Keberhasilan proses fertilisasi ditandai dengan terbentuknya zigot. Zigot adalah hasil peleburan antara sel spermatozoa sebagai gamet jantan dan ovum sebagai sel kelamin betina. Zigot akan mengalami perkembangan lebih lanjut menjadi embrio.

Kemampuan fertilisasi dapat terhambat mulai dari proses fertilisasi, perkembangan embrio pra-implantasi maupun perkembangan embrio pasca implantasi. Kegagalan fertilisasi berakibat pada kegagalan fusi spermatozoa dengan sel telur. Salah satu penyebab kegagalan fertilisasi atau antifertilitas adalah adanya antibodi terhadap spermatozoa yang akan menurunkan daya fertilisasi. Pada hewan poliotokus, penurunan daya fertilitas dapat diamati dari jumlah embrio terimplantasi (Austin dan Shorts, 1985). Menurut Alexander dan Anderson (1987) serta Bohring dan Krause (2003), *antisperm antibody* (ASA) berpengaruh pada proses fertilisasi meliputi aglutinasi spermatozoa, reduksi motilitas, gangguan penetrasi mukus servik, menghambat aktivitas zona binding, menghambat zona binding, menghambat pembentukan pronukleus, tidak efisiennya fusi spermatozoa dan telur, peningkatan fagositosis spermatozoa, serta matinya embrio sebelum atau setelah implantasi.

Perkembangan embrio di dalam saluran reproduksi betina sangat dipengaruhi oleh cairan oviduk. Perubahan komposisi cairan oviduk dapat menghambat perkembangan embrio, sehingga terjadi peningkatan jumlah embrio yang mati sebelum implantasi. Perkembangan embrio setelah implantasi juga dipengaruhi oleh induknya melalui plasenta (Gordon, 1994). Lea (1998) menyatakan bahwa oviduk pada sebagian besar Mammalia merupakan tempat pertemuan spermatozoa dengan oosit dan sebagai tempat inisiasi proses fertilisasi. Ia menganalisis respon imun pada serum dan cairan oviduk akibat imunisasi protein sperma SP 17 dan peptida sintetik SP 17. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 96,7% terjadi respon antibodi dan mengenal protein spermatozoa SP 17.

Menurut Rugh (1986), adanya zat-zat yang bersifat embriotoksik dapat menyebabkan terjadinya kematian intrauterus. Taylor (1986) menyatakan bahwa jumlah fetus yang dapat dihasilkan pada saat partus merupakan indikasi yang baik untuk melihat daya fertilisasi dari hewan politokus. Jumlah fetus yang sedikit dengan jumlah korpus luteum yang lebih banyak menandakan terjadinya antifertilitas.

Griffin dan Jones (1991) menyatakan bahwa aktif imunisasi dengan LDH-X atau LDH-C4 dari mencit dan peptida sintetik menyebabkan reduksi fertilitas pada beberapa spesies binatang (mencit dan tikus putih 55%, kelinci 70%, dan babon 30%). Sedangkan, aktif imunisasi dengan enzim *acrosin* dan atau *hyaluronidase* pada kelinci dan domba tidak mengakibatkan reduksi fertilitas.

## **BAB III HIPOTESIS, TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN TAHUN PERTAMA**

### **3.1. Hipotesis Penelitian**

Hipotesis penelitian yang disusun berdasarkan kajian teori tersebut di atas adalah sebagai berikut:

- a) Lama waktu imunisasi mempengaruhi titer antibodi terhadap spermatozoa pada kelinci jantan.
- b) Antibodi terhadap spermatozoa mampu menghambat motilitas dan mempengaruhi morfologi spermatozoa.
- c) Spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vivo* tidak mampu membuahi oosit melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*.
- d) Spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vitro* tidak mampu membuahi oosit melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*.

### **3.2. Tujuan Penelitian**

Tujuan akhir penelitian tahun kedua adalah mengetahui pengaruh protein membran spermatozoa kelinci sebagai penghambat spermatozoa secara *in-vivo* dan *in-vitro* pada fertilisasi *in-vitro*.

Tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. mengimunisasi 2 kelinci betina untuk produksi antibodi terhadap spermatozoa.
2. mengimunisasi 5 kelinci jantan dengan protein membran spermatozoa.
3. mengamati pengaruh waktu imunisasi terhadap titer antibodi (ASA).
4. mengamati pengaruh ASA terhadap motilitas dan morfologi spermatozoa.

5. mengetahui pengaruh penghambatan ASA pada spermatozoa secara *in-vivo* pada fertilisasi *in-vitro*.
6. mengetahui pengaruh penghambatan ASA pada spermatozoa secara *in-vitro* pada fertilisasi *in-vitro*.

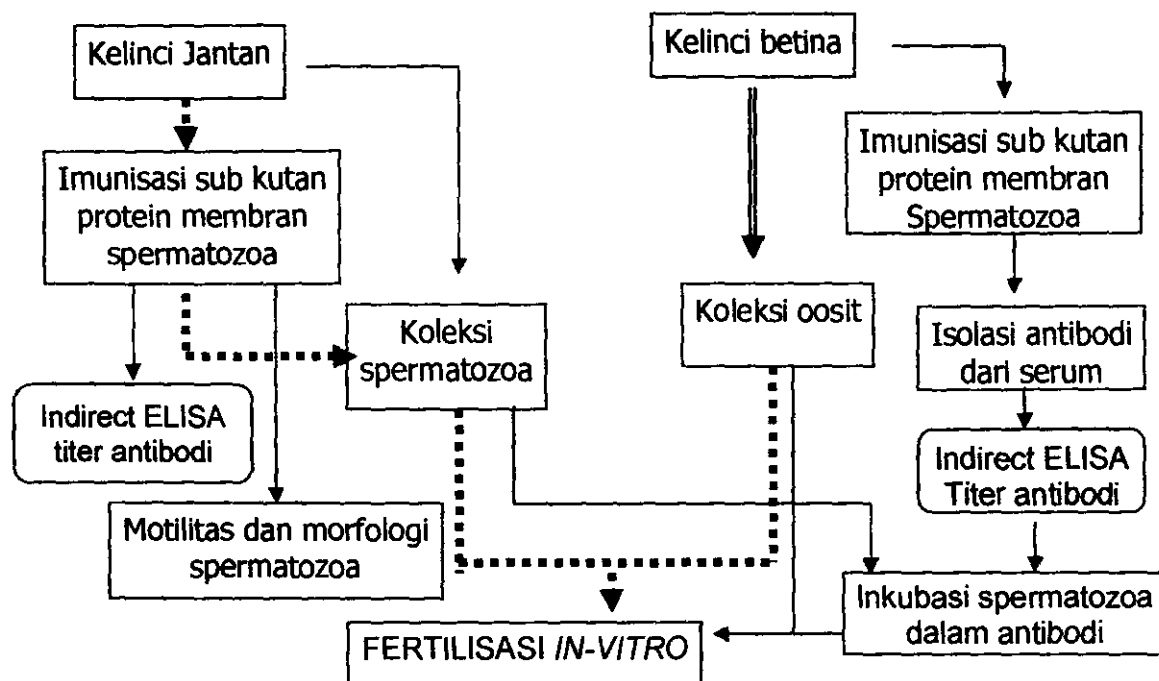
### 3.3. Manfaat Penelitian

Hasil yang ditargetkan dalam penelitian ini adalah mengetahui kemampuan *antisperm antibody* (ASA) dalam menghambat spermatozoa baik secara *in-vivo* dan *in-vitro* pada fertilisasi *in-vitro*.

Hasil penelitian ini merupakan temuan baru tentang protein membran spermatozoa yang berpotensi untuk memproduksi dan pembuatan vaksin kontrasepsi pada pria. Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat dalam upaya untuk pengembangan imunokontrasepsi yang aman, murah, tidak menimbulkan efek samping, dan bersifat tidak permanen (*reversible*). Hasil penelitian diharapkan juga mendukung pengembangan vaksin kontrasepsi masa depan yang berorientasi pada vaksin dari hasil rekayasa genetik (vaksin rekombinan).

## BAB IV METODE PENELITIAN

### Bagan alir penelitian tahun kedua



Gambar 4.1 Bagan alir penelitian tahun kedua

### 4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di 2 tempat. Pertama, di Laboratorium Biologi Reproduksi dan Kandang Hewan Coba, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga. Kedua, di *Institut of Tropical Disease (ITD)*, Universitas Airlangga. Penelitian selama 9 bulan di awali bulan Maret sampai dengan Nopember 2008.

### 4.2. Bahan Penelitian Tahun Pertama

1. Bahan untuk koleksi dan isolasi protein membran spermatozoa dari kelinci jantan: 40 pasang kauda epididimis kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) strain lokal, *phosphate buffer saline* (PBS), *dry ice*, akuades, *potassium phosphate buffer* (PPB) pH 7,4,

magnesium sulfat ( $\text{MgSO}_4$ , 2mM), natrium klorida ( $\text{NaCl}$ , 0,085% dan 0, 2 M), *octyl-beta-D-thioglucopyranoside* (OSGP, 1%), gliserol (10%), Tris (20 mM, pH 8,6), dan inhibitor protease, kapas, alkohol 70%.

2. Bahan untuk pengukuran konsentrasi protein: *Biorad protein assay*, akuabides.
3. Bahan untuk imunisasi kelinci : 10 ekor kelinci jantan dan 2 ekor kelinci betina strain lokal (umur 1,5 tahun, berat antara 1,2 – 1,8 kg) *Freund's complete adjuvant* (FCA) dan *Freund's incomplete adjuvant* (FICA),  $\text{NaCl}$  fisiologis.
4. Bahan untuk Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA): *Protein Detector ELISA Kit* yang terdiri dari *coating buffer*, *BSA dilution/blocking solution*, *wash solution*, *50% glycerol*, *2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonate)* (ABTS) *substrate solution*, *peroxidase solution*, *peroxidase stop solution*, *peroxidase-labeled antibody* (*horseradish peroxidase/HRP goat anti-rabbit IgG*).
5. Bahan untuk menguji motilitas dan morfologi spermatozoa: *phosphat buffer saline* (PBS), *Eosin 1 %*, *Nigrosin 10 %*, etanol 70%.
6. Bahan untuk fertilisasi *in-vitro* : *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG), *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Medium M2*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *gentamicin*,  $\text{NaCl}$  fisiologis dan *mineral oil*

#### 4.3. Alat Penelitian

ELISA *plate* 96 sumuran, pipet mikro, tip (*blue type*, *yellow type* dan *white type*), tabung reaksi, tabung konikel 15 ml, gelas beker, *microtube*, jarum injeksi 1, 5 dan 20 ml, kertas pH, timbangan analitik, gelas ukur, *refrigerated centrifuge* (Beckman Optima™ LE-80K *Ultracentrifuge* dan *Heitech Centrifuge*), spektrofotometer (UV-1700 *pharmaspec*, *UV-visible spectrophotometer*, Shimadzu), ELISA reader, *petridish*,

perangkat alat bedah, cawan petri *disposable* (*Nunc*), pipet *pasteur* (*German*), *millipore* 0,22  $\mu\text{m}$ , gunting, pinset, pipet modifikasi, *incubator*  $\text{CO}_2$ , almari es, mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, mikroskop *disecting*, timbangan *digital*, *laminar flow*, ultrasonikasi (*Ultrasonic Homogenizer 4710 Series*), mikrometer, *hand counter*, gelas obyek, dan *stop watch*

#### **4.4. Prosedur Penelitian**

##### **4.4.1. Tahap koleksi spermatozoa dalam penyiapan antigen**

Kelinci jantan yang telah dewasa dibedah untuk diambil testisnya. Koleksi spermatozoa dilakukan menurut Goyal *et al.* (2001), dengan cara epididimis dan vas deferens dipisahkan secara perlahan dari lemak dan testis. Kemudian dipisahkan bagian kauda dari bagian lainnya (kaput dan korpus), lalu diletakkan dalam cawan petri yang berisi 4 ml larutan fisiologis. Spermatozoa kelinci dikoleksi dengan metode *flushing* (Haila dan Daulat, 2001; Hayati, 2007) yaitu dengan menggunakan jarum suntik yang berisi 1 ml larutan garam fisiologis dimasukkan ke saluran epididimis. Selanjutnya, jarum ditekan pelan-pelan sehingga larutan garam fisiologis dapat mendorong spermatozoa yang ada di daerah di vas deferens dan epididimis. Selanjutnya spermatozoa ditampung di *microtube*, kemudian disentrifus pada 1600 rpm selama 10 menit pada  $4^{\circ}\text{C}$ , pelet dikoleksi.

##### **4.4.2. Tahap isolasi protein membran spermatozoa**

Isolasi membran spermatozoa kelinci mengacu pada metode Bohring *et al.* (2001), Chitra *et al.* (2001), Rajeev dan Reddy (2004), serta Vernet *et al.* (2001), Koleksi pelet diresuspensi dalam keadaan hipo-osmotik dalam 10 mM PPB, pH 7,4, kemudian di homogenkan selama 5 menit dan disonikasi selama 8 x 15 menit.

Suspensi tersebut selanjutnya disentrifus pada 1600 rpm selama 10 menit pada 4°C, supernatan dikoleksi (S<sub>1</sub>). Pelet diresuspensi lagi dalam 10 mM PPB, selanjutnya medium tersebut disentrifus lagi pada 1600 rpm selama 10 menit pada 4°C, supernatan dikoleksi (S<sub>2</sub>). Langkah seperti ini diulangi hingga mendapatkan supernatan yang cukup untuk mengisi tabung ultrasentrifus. Supernatan S<sub>1</sub> dicampur dengan supernatan S<sub>2</sub> dan 0,2 M NaCl dan 2 mM MgSO<sub>4</sub>. Selanjutnya campuran tersebut disentrifus pada 1600 rpm selama 30 menit pada 4°C untuk memisahkan mitokondria dari fraksi membran plasma. Supernatan yang mengandung membran plasma diultrasentrifus lagi pada 40.000 rpm selama 90 menit pada 4°C kemudian pelet yang mengandung membran plasma diekstraksi dengan 1% OSGP (w:v), 10% gliserol (v:v), 20 mM Tris, pH 8,6, mengandung inhibitor protease, dihomogenkan dengan vortex selama 30 menit pada 4°C. Fraksi larutan protein membran spermatozoa dikumpulkan.

#### **4.4.3. Pengukuran konsentrasi protein antigen dan antibodi**

Pengukuran konsentrasi protein antigen dan antibodi dengan Bio-Rad Protein Assay yang didasarkan pada metode Bradford, menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hal pertama yang dilakukan untuk mengukur konsentrasi protein antigen adalah membuat larutan blanko dan larutan sampel. Pembuatan larutan blanko dilakukan dengan cara: larutan Bio-Rad 200 µl ditambah 800 µl akuades steril. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan cara melarutkan larutan antigen 4 µl dalam larutan 200 µl Bio-Rad dan 796 µl akuades steril. Larutan blanko dan larutan sampel ditampung dalam mikrokuvet. Selanjutnya larutan blanko dan larutan sampel diukur nilai absorbansinya (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kandungan gugus-gugus asam amino dalam protein akan menyerap pada panjang gelombang 595 nm sehingga



didapatkan nilai absorbansinya. Konsentrasi protein dapat dihitung bila terlebih dahulu dibuat kurva baku protein menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi protein dengan nilai absorbansinya berdasarkan perhitungan regresi linear.

Dari data OD tersebut, maka kita dapat mengetahui kadar protein antigen yang akan diimunisasikan pada kelinci dengan cara sebagai berikut.

- a. Memasukkan masing-masing nilai OD pada persamaan regresi linear yang didapat dari grafik kurva baku standar (Wahyuningsih, 2006):

$$X \mu\text{g}/\mu\text{l} = \frac{\frac{Y - 0.1169}{0.0209}}{4}$$

Keterangan: x = konsentrasi protein  
y = nilai absorbansi

Untuk mendapatkan suspensi yang mengandung protein antigen 200 µg yaitu volume yang diperlukan untuk imunisasi kelinci.

$$\text{Volume Ag} = \frac{\text{Konsentrasi Ag yang akan diimunisasikan}}{\text{Konsentrasi Ag dari hasil persamaan regresi linier}} \times 1 \mu\text{l}$$

#### 4.4.4. Imunisasi kelinci

Hewan coba dibagi 3 kelompok. Kelompok 1, dua ekor kelinci betina diimunisasi dengan protein membran spermatozoa untuk produksi antibodi. Kelompok 2, lima ekor kelinci jantan diimunisasi dengan protein membran spermatozoa untuk pengamatan titer antibodi, motilitas dan morfologi spermatozoa. Kelompok 3 (kontrol), lima ekor kelinci jantan diimunisasi tanpa antigen. Imunisasi dilakukan secara subkutan yang meliputi tiga tahap yaitu imunisasi I, II, dan III dengan selang waktu 21 hari.

Pada imunisasi pertama, protein membran spermatozoa 200 µg/ml diemulsikan dengan garam fisiologis sampai volume 0,1 ml dan *freund's complete adjuvant* (FCA)

0,1 ml (perbandingan 1:1), kemudian di vortex selama 1 jam. Ada dua lokasi penyuntikan masing-masing 0,1 ml di subkutan leher. Imunisasi kedua dilakukan 21 hari berikutnya dengan campuran antigen dalam garam fisiologis dan *freund's incomplete adjuvant* (FICA) 0,1 mL dengan perbandingan 1:1. Imunisasi ketiga dilakukan 21 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi kedua.

Pada imunisasi pertama kontrol, *freund's complete adjuvant* (FCA) 0,1 ml dan garam fisiologis 0,1 mL (perbandingan 1:1) divortek selama 1 jam. Imunisasi kedua dilakukan injeksi dengan campuran *freund's incomplete adjuvant* (FICA) 0,1 ml dan garam fisiologis 0,1 ml dengan perbandingan 1:1. Imunisasi ketiga dengan cara dan bahan yang sama seperti pada imunisasi kedua.

#### 4.4.5 Pengambilan serum

Setelah 1 minggu dari imunisasi terakhir, darah kelinci betina diambil melalui jantung sebanyak 20 ml. Darah ditampung dalam tabung konikel. Kemudian, darah dibiarkan pada suhu 4°C, selama 24 jam. Darah di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, selama 10 menit, suhu 4 °C. Serum dikoleksi untuk pengukuran konsentrasi antibodi, pengukuran titer antibodi dan penghambatan spermatozoa secara *in-vitro*.

Pada kelinci jantan, darah diambil dari *vena auricularia*. Pengambilan darah sebanyak 4 kali, yaitu sebelum imunisasi (pre-imun), 21 hari setelah imunisasi I, II, dan III. Darah ditampung dalam *Eppendorf*, dibiarkan pada suhu 4°C, selama 24 jam. Selanjutnya darah di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, selama 10 menit, suhu 4 °C. Serum dikoleksi untuk pengukuran titer antibodi.

#### 4.4.6. Pengukuran titer antibodi dengan ELISA

Titer antibodi diukur dengan metode *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Setiap sumuran dari ELISA *plate* diisi 100  $\mu$ l larutan antigen protein spermatozoa dengan konsentrasi 5  $\mu$ g/ml dalam *coating buffer* dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Cawan mikrotiter dikosongkan dan ditambahkan 200  $\mu$ l larutan *blocking* (BSA 1%). Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 10 menit. Cawan mikrotiter dikosongkan dan setiap sumuran diisi 100  $\mu$ l serum kelinci yang telah diimunisasi atau serum kontrol. Serum diencerkan secara berseri, yaitu 3<sup>-1</sup>, 3<sup>-2</sup> dan seterusnya sampai 3<sup>-10</sup>. Cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran diisi dengan 100  $\mu$ l larutan konjugat IgG *goat anti rabbit peroxidase* dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/ml dalam 50% gliserol dan BSA 1%. Kemudian, cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Cawan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran ditambah substrat ABTS sebanyak 100  $\mu$ l (1 mg/ml dalam bufer substrat dan 0,3  $\mu$ l hidrogen peroksida). Cawan ditutup aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Jika sudah timbul warna, maka cawan diberi larutan penghenti (*stop solution*). Selanjutnya, titer antibodi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

#### 4.4.7. Koleksi spermatozoa untuk fertilisasi *in-vitro*

21 hari setelah imunisasi ke-3, masing-masing kelinci jantan dan kelinci kontrol dibedah bagian abdomen untuk diambil testisnya. Epididimis dan vas deferens dipisahkan secara perlahan dari lemak dan testis. Kemudian epididimis dipisahkan bagian kauda dari bagian lainnya (kaput dan korpus), lalu diletakkan dalam cawan petri yang berisi 4 ml larutan fisiologis. Spermatozoa kelinci dikoleksi dengan metode

*flushing* (Haila dan Daulat, 2001), yaitu menggunakan jarum suntik yang berisi 1 ml larutan garam fisiologis kemudian dimasukkan dalam saluran epididimis. Selanjutnya, jarum ditekan pelan-pelan sehingga larutan garam fisiologis dapat mendorong spermatozoa yang ada di daerah di vas deferens dan epididimis. Sebagian spermatozoa untuk diamati motilitas dan morfologinya, sebagian spermatozoa digunakan untuk fertilisasi *in-vitro*.

#### 4.4.8. Pengamatan motilitas dan morfologi spermatozoa

Pengukuran motilitas spermatozoa dilakukan dengan cara meletakkan satu tetes suspensi spermatozoa dalam gelas obyek cekung dan ditutup kaca penutup. Skala mikrometer diletakkan pada lensa obyektif. Kecepatan motilitas spermatozoa diketahui dengan mengukur jarak yang ditempuh oleh spermatozoa tiap detik ( $\mu\text{m}/\text{detik}$ ) dengan mikroskop cahaya, untuk mengukur kecepatan motilitas spermatozoa, secara acak dipilih spermatozoa yang bergerak lurus ke depan (*progresif*) dengan pembesaran mikroskop 400x (Goyal *et al.*, 2001). Pengamatan dilakukan pada 100 spermatozoa dan diulang sebanyak 10 kali.

Pengamatan morfologi spermatozoa dilakukan dengan mengambil satu tetes suspensi spermatozoa, diletakkan di atas gelas obyek dan dibuat *smear* (apusan), dikeringkan pada suhu kamar (kering angin) kemudian difiksasi dengan etanol 70 % selama 2 menit, kemudian ditambahkan 1 % eosin dan nigrosin 10% selama 10 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir secara pelan. Setelah itu dikering-anginkan pada suhu kamar (Goyal *et al.*, 2001; Hayati, 2007). Pengamatan morfologi dilakukan pada 100 spermatozoa per preparat dengan ulangan 10 kali dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Data pengamatan meliputi bentuk morfologi normal dan

abnormal, kemudian dinyatakan dalam persentase (%). Menurut Hafez and Hafez (2005), spermatozoa mempunyai morfologi yang normal, apabila kepala bulat lonjong dengan bagian anterior lebih membulat dari posterior, leher lurus dan ekor tunggal berujung bebas. Morfologi abnormal jika kepala lebih kecil, lebih besar, memanjang, tidak ada atau sedikit area akrosom, mempunyai dua kepala satu ekor, leher lebih tebal, lebih kecil, bengkok, ekor bengkok, pendek, melingkar dan patah serta adanya sisa sitoplasma yang melekat (*cytoplasmic droplet*) pada kepala, leher atau ekor.

#### **4.4.9. Pengamatan penghambatan spermatozoa *in-vivo* dan *in-vitro* pada fertilisasi *in-vitro***

##### **a. Uji fertilitas kelinci jantan.**

Kelinci jantan yang akan digunakan untuk penelitian ini dikawinkan secara *monomating* dengan kelinci betina. Bila kelinci betina yang dikawinkan berhasil bunting maka kelinci jantan pasangannya dinyatakan fertil. Hanya kelinci-kelinci jantan yang fertil, digunakan pada penelitian ini.

##### **b. Inkubasi spermatozoa dengan antibodi**

Spermatozoa dikoleksi dari kelinci jantan hasil uji fertilitas yang belum diimunisasi. Spermatozoa diinkubasi dalam berbagai konsentrasi antibodi yang berasal dari serum kelinci betina hasil imunisasi. Konsentrasi antibodi yang digunakan adalah 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5, dan 10  $\mu\text{g/ml}$  (Rajeev dan Reddy, 2004).

##### **c. Superovulasi pada kelinci betina**

Kelinci betina dewasa, tetapi belum pernah bunting disuntik dengan hormon *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) dengan dosis 150 IU. Selama 48 jam kemudian disuntik dengan hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dengan dosis

50 IU dan langsung dikawinkan dengan kelinci jantan yang sudah divasektomi secara *monomating*. Setelah 17 jam, kelinci dibius dan dibedah untuk koleksi sel telur.

d. Koleksi sel telur

Kelinci betina dikorbakan. Kemudian dibedah untuk mengeluarkan organ tuba falopii dan uterus. Tuba falopii dan uterus dicuci dengan larutan *phosphate buffer saline* (PBS), kemudian ditampung pada *petridish*, selanjutnya dilakukan *flushin*. *Flushing* dilakukan dengan menyemprotkan cairan PBS melalui tuba falopii dan kemudian diamati di bawah mikroskop *inverted*.

e. Fertilisasi *in-vitro*

Fertilisasi menggunakan spermatozoa dari 5 ekor kelinci yang sudah diimunisasi dengan protein membran spermatozoa, dan spermatozoa yang telah diinkubasi dengan berbagai konsentrasi antibodi: 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5, dan 10  $\mu\text{g/ml}$ . Sel telur yang sudah dikoleksi selanjutnya dicuci berturut-turut sebanyak tiga kali pada medium PBS dan M 2. Sel telur yang sudah dicuci kemudian dipindahkan pada medium fertilisasi. Kemudian spermatozoa ditanamkan pada medium fertilisasi yang sudah ada sel telurnya. Sel telur yang sudah bercampur spermatozoa kemudian diinkubasi pada inkubator  $\text{CO}_2$  5% dengan suhu  $37^\circ \text{C}$  selama 12 jam. Setelah inkubasi dihitung persentase tingkat fertilisasi berdasarkan terbentuknya zigot, adanya *polar body II* pada inti sel telur, serta adanya kepala spermatozoa pada inti sel telur.

#### 4.5. Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diamati dalam penelitian ini adalah :

- a. Variabel terikat : titer antibodi, kecepatan motilitas spermatozoa, persentase morfologi spermatozoa normal, dan jumlah telur yang terfertilisasi.
- b. Variabel bebas : waktu imunisasi, konsentrasi antibodi.
- c. Variabel terkontrol : dosis antigen, teknik imunisasi, kondisi kultur, kondisi kandang (suhu, kelembaban, intensitas cahaya), pakan, air minum, kondisi inkubator, medium, koleksi sperma dan sel telur.

#### 4.6. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan penyediaan hewan coba dilakukan secara acak. Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap.

#### 4.7. Analisis Data

Data berupa titer antibodi kelinci jantan dan jumlah telur terfertilisasi karena penghambatan *in vitro* dianalisis dengan anava. Bila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji LSD. Data kecepatan motilitas dan morfologi spermatozoa, serta jumlah telur terfertilisasi karena penghambatan spermatozoa *in-vivo* dianalisis dengan Kruskal-Wallis. Data dianalisis dengan menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.00 for Windows*.

## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Pengaruh waktu pemberian imunisasi terhadap titer antibodi terhadap protein membran spermatozoa pada kelinci jantan.

Titer antibodi ditentukan dengan teknik ELISA. Antibodi diencerkan dari  $3^{-1}$ ,  $3^{-2}$ ,  $3^{-3}$  dan seterusnya sampai  $3^{-10}$ . Pengujian titer antibodi dengan ELISA lebih sensitif dan spesifik karena teknik ELISA ini didasarkan pada reaksi antara antigen dan antibodi. Titer antibodi ditunjukkan dengan nilai OD. Pada penelitian ini dilakukan 4 pengukuran titer antibodi, yaitu titer antibodi sebelum imunisasi (pre-imun), setelah imunisasi I, II, dan III. Hasil penentuan titer antibodi dapat dilihat pada tabel 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 dan 5.5.

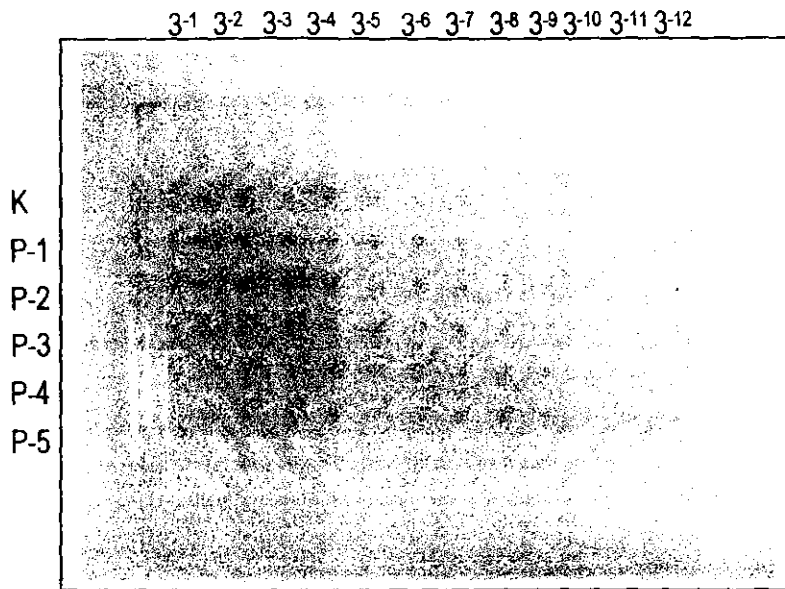
Tabel 5.1. Titer antibodi sebelum imunisasi (pre-imunisasi)

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	0,438	0,416	0,606	0,460	0,444	0,412	0,388	0,378	0,438	0,428	0,399	0,324
P-2	0,698	0,653	0,623	0,577	0,542	0,525	0,543	0,433	0,410	0,377	0,361	0,332
P-3	0,543	0,522	0,431	0,428	0,417	0,387	0,365	0,211	0,207	0,115	0,106	0,098
P-4	0,856	0,902	0,968	0,707	0,819	0,800	0,691	0,697	0,568	0,530	0,553	0,342
P-5	0,443	0,423	0,415	0,398	0,376	0,358	0,342	0,321	0,319	0,312	0,296	0,275

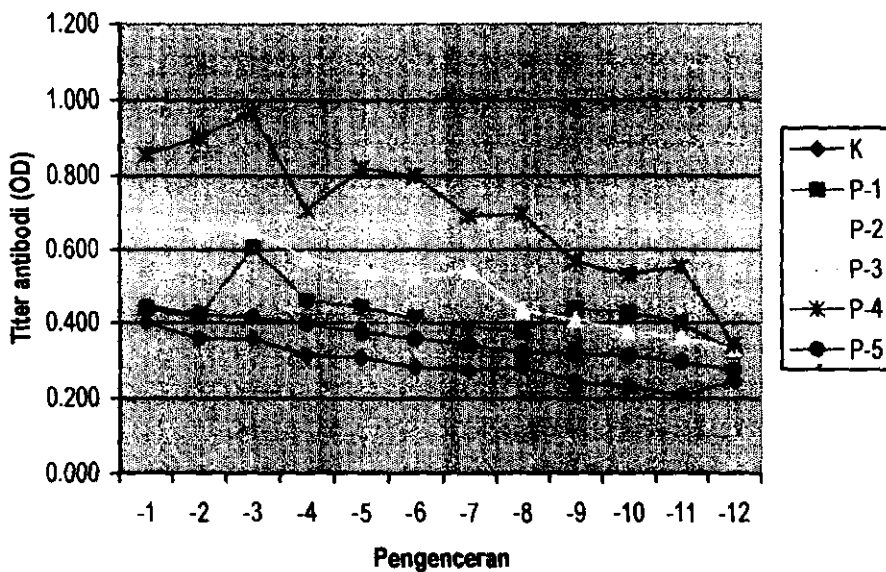
Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

Titer antibodi pre-imunisasi didapatkan sebelum hewan coba diimunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 5.1, Gambar 5.1 dan 5.2). Nilai OD puncak yang didapatkan adalah 0,606; 0,698; 0,543; 0,968 dan 0,443. Nilai OD pre-imun kurang dari 2 kali dari nilai OD kontrol negatif. Hal itu menunjukkan bahwa belum ada pembentukan antibodi terhadap protein membran spermatozoa.





Gambar 5.1 Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi yang diuji dengan metode ELISA



Gambar 5.2 Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

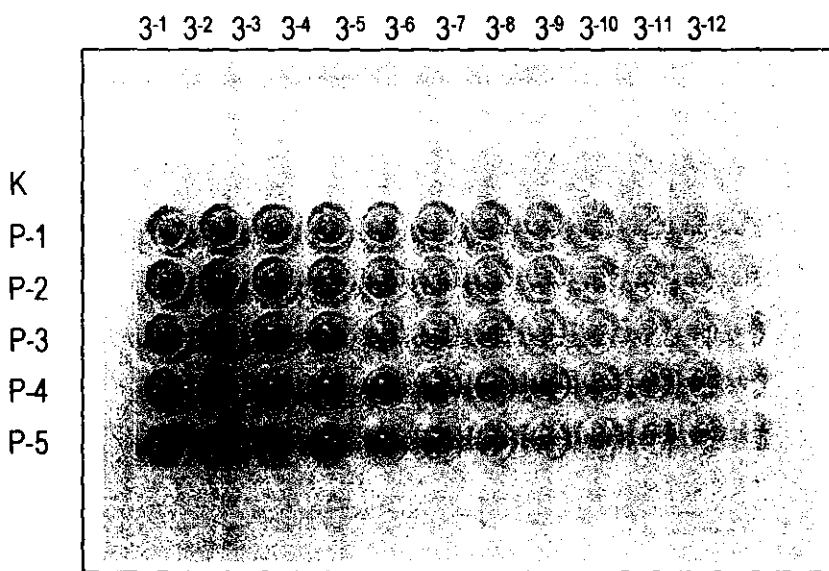
Titer antibodi setelah imunisasi pertama didapatkan setelah hewan coba dimunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 5.2, Gambar 5.3 dan 5.4). Nilai OD puncak adalah 1,395; 1,557; 1,414; 1,618; dan 1,467. Bila dibandingkan dengan kontrol negatif didapatkan nilai OD lebih dari 3 kali. Hal ini menunjukkan bahwa imunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa telah menstimulasi

pembentukan antibodi terhadap protein membran spermatozoa. Interaksi antigen dan antibodi masih dapat terbaca bagus pada pengenceran 3<sup>4</sup> - 3<sup>7</sup>, dengan nilai OD > 1.

Tabel 5.2. Titer antibodi setelah imunisasi pertama

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9	3-10	3-11	3-12
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,313	1,350	<b>1,395</b>	1,318	1,158	0,968	<b>1,171</b>	0,743	0,578	0,493	0,445	0,425
P-2	<b>1,557</b>	1,481	1,365	1,249	1,127	1,032	<b>1,198</b>	0,786	0,642	0,555	0,499	0,415
P-3	<b>1,414</b>	1,300	1,192	<b>1,061</b>	0,979	0,754	0,876	0,551	0,463	0,402	0,394	0,379
P-4	1,581	<b>1,618</b>	1,462	1,300	1,233	1,048	<b>1,145</b>	0,709	0,589	0,508	0,462	0,374
P-5	<b>1,467</b>	1,449	1,326	<b>1,197</b>	0,981	0,859	0,920	0,643	0,497	0,437	0,387	0,340

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan



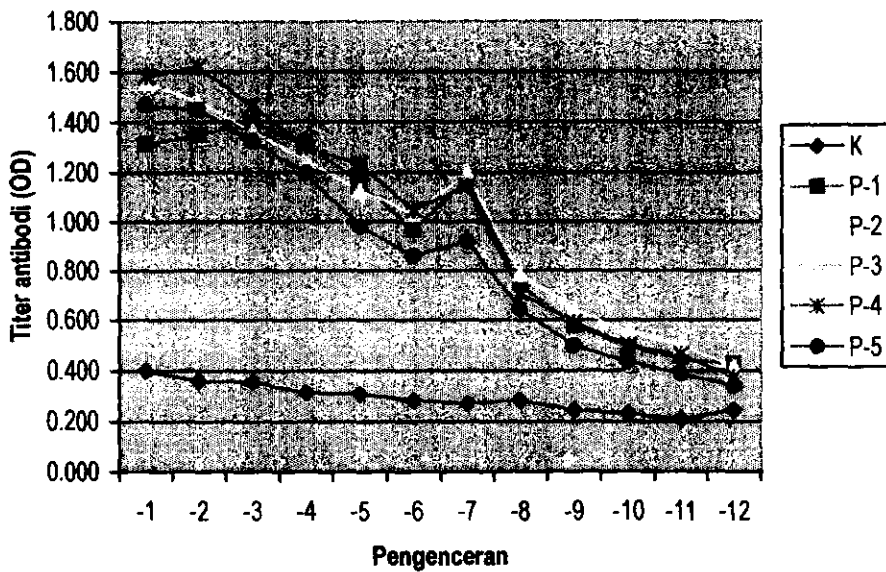
Gambar 5.3 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi I yang diuji dengan metode ELISA

Titer antibodi setelah imunisasi kedua didapatkan setelah hewan coba dimunisasi dua kali dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 5.3, Gambar 5.5 dan 5.6). Nilai OD puncak adalah 1,690; 1,800; 1,785; 1,830; dan 1,781.

Bila dibandingkan dengan kontrol negatif didapatkan nilai OD lebih dari 4 kali.

Hal ini menunjukkan bahwa imunisasi kedua dengan antigen yang sama telah lebih

banyak lagi menstimulasi pembentukan antibodi. Interaksi antigen dan antibodi masih terbaca bagus pada pengenceran  $3^{-6}$  –  $3^{-8}$ .

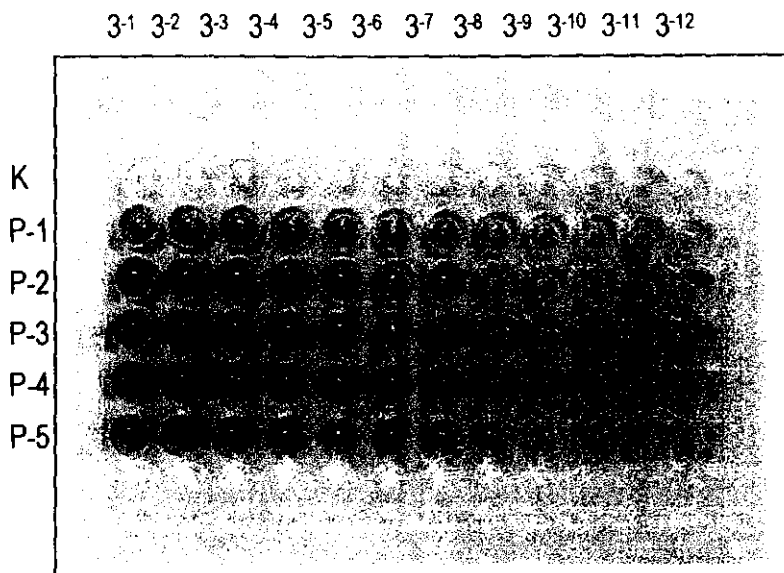


Gambar 5.4 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi pertama pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa  $200 \mu\text{g/ml}$ , 1-5 = jumlah ulangan

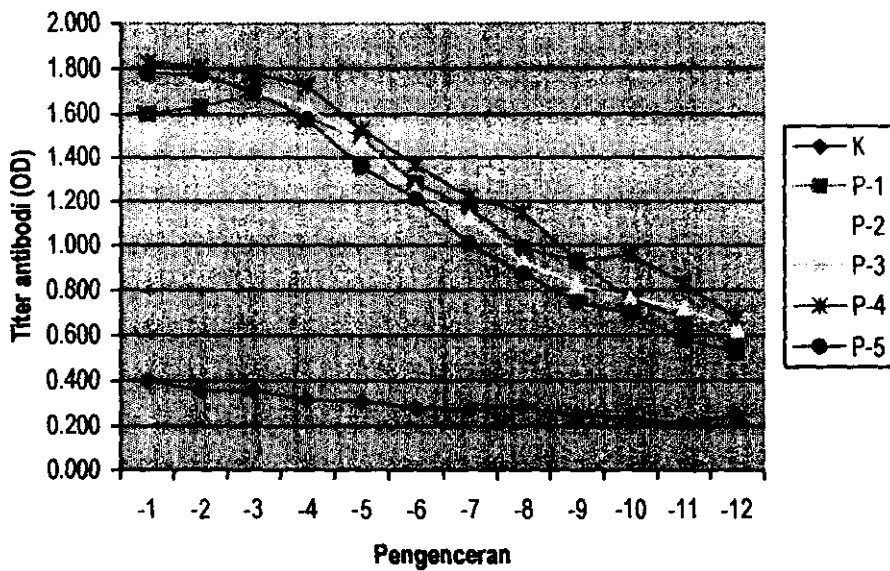
Tabel 5.3. Titer antbodi setelah imunisasi kedua

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,600	1,631	<b>1,690</b>	1,580	1,493	1,281	<b>1,174</b>	0,990	0,929	0,763	0,675	0,551
P-2	<b>1,800</b>	1,761	1,706	1,630	1,470	1,251	<b>1,128</b>	0,927	0,823	0,767	0,721	0,632
P-3	1,747	<b>1,785</b>	1,617	1,538	1,294	<b>1,101</b>	0,974	0,831	0,745	0,704	0,610	0,677
P-4	<b>1,830</b>	1,807	1,779	1,725	1,530	1,367	1,221	<b>1,150</b>	0,932	0,958	0,829	0,677
P-5	<b>1,781</b>	1,771	1,697	1,574	1,358	1,213	<b>1,009</b>	0,874	0,747	0,696	0,584	0,524

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa  $200 \mu\text{g/ml}$ , 1-5 = jumlah ulangan



Gambar 5.5 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi II yang diuji dengan metode ELISA



Gambar 5.6 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi kedua pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

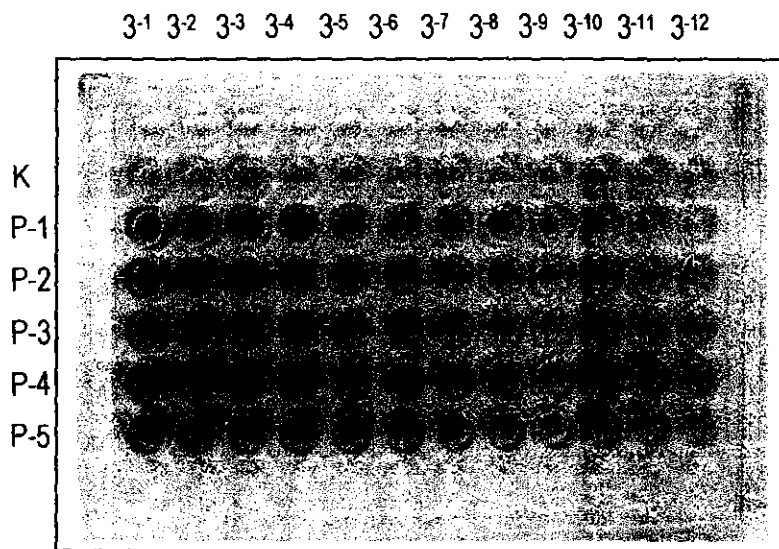
Titer antibodi setelah imunisasi ketiga didapatkan setelah hewan coba dimunisasi tiga kali dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 5.4, Gambar 5.7 dan 5.8). Nilai OD puncak adalah 1,794; 1,811; 1,729; 2,110; dan 1,822. Bila dibandingkan dengan kontrol negatif (0,400) didapatkan nilai OD pada imunisasi ketiga

lebih dari 4 kali. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi lagi pembentukan antibodi akibat imunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa.

Tabel 5.4. Titer antibodi setelah imunisasi ketiga

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,779	1,779	1,794	1,757	1,654	1,532	1,422	1,251	1,203	1,004	0,998	0,885
P-2	1,811	1,809	1,769	1,792	1,718	1,596	1,522	1,431	1,352	1,195	1,097	0,980
P-3	1,729	1,628	1,582	1,610	1,511	1,455	1,313	1,232	1,260	1,106	1,042	1,004
P-4	1,937	2,110	1,854	1,836	1,729	1,611	1,473	1,282	1,183	1,148	0,992	0,914
P-5	1,822	1,813	1,765	1,725	1,583	1,486	1,365	1,306	1,244	1,111	1,061	0,981

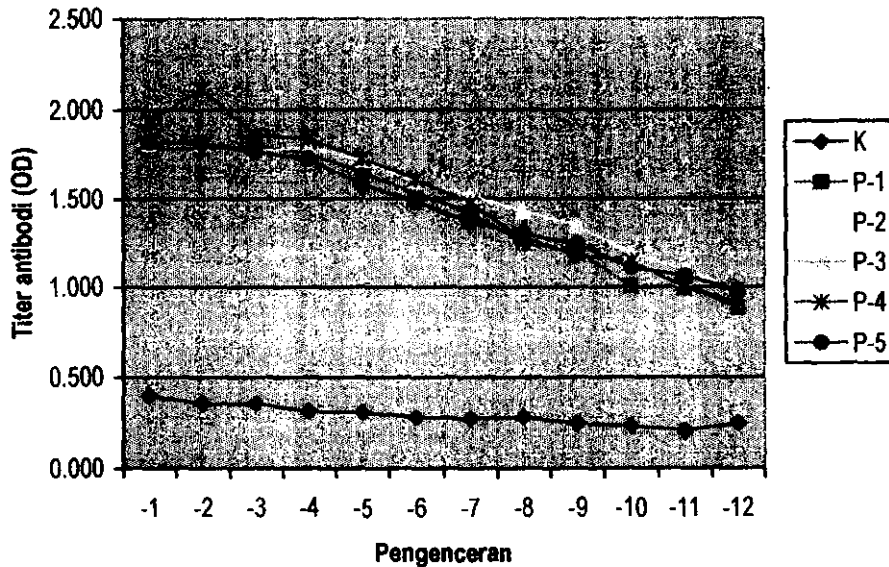
Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan



Gambar 5.7 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi III yang diuji dengan metode ELISA

Hasil analisis titer antibodi dengan uji Anava menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ) sehingga analisis dilanjutkan dengan uji LSD. Jika titer antibodi antara pre-imunisasi, imunisasi I, II, dan III dibandingkan, didapatkan bahwa titer antibodi antara pre-imunisasi (0,652) berbeda nyata secara signifikan dengan imunisasi I (1,490), II (1,777), dan III (1,853). Titer antibodi antara hasil imunisasi I berbeda nyata secara signifikan dengan hasil imunisasi II. Sedangkan, antara hasil

imunisasi II dengan imunisasi III menunjukkan perbedaan tetapi tidak signifikan (Tabel 5.5).



Gambar 5.8 Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi ketiga pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

Tabel 5.5 Rerata titer antibodi (nilai OD) dan pengenceran pada saat per-imunisasi, setelah imunisasi pertama, kedua, ketiga

Waktu Imunisasi	Nilai OD puncak pada ulangan ke ..					Rata ± SD	Pengenceran pada ulangan ke ...				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Pre-imun	0,606	0,698	0,543	0,968	0,443	0,652 a ± 0,200	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi I	1,395	1,557	1,414	1,618	1,467	1,490 b ± 0,095	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi II	1,690	1,800	1,785	1,830	1,781	1,777 c ± 0,052	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi III	1,794	1,811	1,729	2,110	1,822	1,853 c ± 0,148	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Anava dan LSD

Menurut Austyn dan Wood (1994) dan Bellanti (1993), terdapat dua respon imun yang terjadi sebelum pembentukan antibodi. Respon imun tersebut adalah respon imun primer dan respon imun sekunder. Reaksi awal saat pemaparan pertama antigen

protein membran spermatozoa menimbulkan respon imun berupa fagositosis antigen tersebut oleh sel fagosit polimorfonuklear atau makrofag. Jika pada proses fagositosis ini masih ada antigen yang belum difagosit, maka antigen tersebut akan merangsang respon imun spesifik untuk membentuk antibodi. Respon imun yang terbentuk merupakan respon imun primer. Respon imun primer ini terdiri dari periode induktif dimana selama waktu tersebut antigen dikenal sebagai benda asing dan diproses, dan isyarat (signal) dikirim pada sel-sel yang ditugaskan untuk membuat antibodi. Hal ini merangsang aktivasi sel T untuk mengidentifikasi antigen dan menimbulkan respon humoral untuk pembentukan antibodi antiprotein membran spermatozoa oleh sel B.

Peningkatan titer antibodi setelah imunisasi I, II, dan III menunjukkan telah terjadi respon imun terhadap antigen protein membran spermatozoa. Imunisasi dengan antigen yang sama lebih meningkatkan titer antibodi. Hal itu didukung oleh Goldsby *et al.* (2000), Grudzinskas dan Yovich (1995), dan Herscowitz (1993), setelah timbulnya antibodi pertama dimulailah biosintesis aktif antibodi, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi antibodi secara logaritmik, yang mencapai titer antibodi tertinggi setelah 8-12 hari. Menurut Austyn dan Wood (1994), Goldsby *et al.* (2000), dan Herscowitz (1993), pemaparan kedua terhadap imunogen yang sama akan menyebabkan penambahan respon imun mencolok berupa munculnya sel-sel imonokompeten dan antibodi yang dipercepat. Pada respon sekunder periode laten lebih pendek, angka sintesis antibodi lebih cepat, puncak titer antibodi bertahan lebih lama, daya gabung antibodi lebih tinggi, lebih banyak terdapat sel memori dan lebih banyak Ig G.

## 5.2. Pengaruh antibodi terhadap protein membran spermatozoa pada motilitas dan morfologi spermatozoa

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa kecepatan motilitas dari spermatozoa kontrol (56,489  $\mu\text{m}/\text{dt}$ ) berbeda secara signifikan dengan kecepatan motilitas dari perlakuan (10,284  $\mu\text{m}/\text{dt}$ ) dengan  $P < 0,05$  (Tabel 5.6). Adanya antibodi terhadap protein membran spermatozoa menurunkan kecepatan motilitas. Hasil penelitian didukung oleh pernyataan Arunima *et al.* (2004) bahwa antibodi terhadap *major physiological protein substrate* (MPS) menyebabkan aglutinasi spermatozoa. Fragmen Fab menyebabkan penghambatan motilitas spermatozoa secara signifikan. MPS adalah ekto-protein yang berlokasi pada kepala sperma dan berperan penting untuk regulasi interaksi sperma-telur.

Tabel 5.6 Kecepatan motilitas spermatozoa ( $\mu\text{m}/\text{detik}$ ) kelinci kontrol dan perlakuan

Ulangan	Motilitas spermatozoa ( $\mu\text{m}/\text{dt}$ ) kontrol pada ulangan pengamatan ke..										Rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	62,875	60,550	62,225	61,675	64,025	61,700	55,150	56,600	55,275	48,900	56,489 a $\pm$ 8,321
2	59,650	60,300	60,050	60,725	60,775	58,775	50,625	53,175	45,225	42,875	
3	61,375	64,200	69,050	70,075	65,325	62,500	55,250	52,625	48,325	40,400	
4	65,675	64,150	65,575	62,650	59,975	50,650	45,000	44,325	42,725	41,275	
5	61,000	63,025	62,600	63,800	62,100	60,525	50,350	45,625	41,450	41,700	
Ulangan	Motilitas spermatozoa ( $\mu\text{m}/\text{dt}$ ) perlakuan pada ulangan pengamatan ke..										Rata $\pm$ SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	17,350	13,675	10,850	11,350	9,900	7,675	9,675	4,750	5,675	5,750	10,284 b $\pm$ 3,518
2	15,100	13,850	11,300	12,450	12,075	10,500	8,150	6,750	8,575	10,250	
3	14,475	12,725	8,700	7,600	9,225	9,225	5,200	3,850	4,350	5,425	
4	15,000	14,750	14,775	13,375	12,450	15,425	11,425	12,725	7,275	6,850	
5	13,350	13,100	12,875	13,425	12,300	12,925	8,750	5,325	7,725	7,425	

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Kruskal-Wallis.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase morfologi normal dari spermatozoa kontrol (85,30 %) berbeda secara signifikan dengan persentase morfologi



spermatozoa normal dari perlakuan (32,66 %) dengan  $P < 0,05$  (Tabel 5.7). Adanya antibodi terhadap protein membran spermatozoa menyebabkan morfologi spermatozoa menjadi tidak normal. Menurut Samuel *et al.* (2000), kelinci jantan yang diimunisasi dengan protein 20,1 kDa (*sperm tail component*/SMP-B) dari ekor spermatozoa kelinci menyebabkan halangan spermatogenesis, mengakibatkan azoospermia. Anil *et al.* (2007) menyatakan bahwa sperma diklasifikasikan normal jika kepala oval dan garis batas halus, adanya akrosom dikepala 40-70 %, mempunyai pewarnaan homogen dengan tidak ada cacat pada leher (*midpiece*) dan ekor, serta tidak ada droplet sitoplasma (>30%).

Tabel 5.7 Persentase morfologi spermatozoa normal (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan, serta analisis statistik

Ulangan	Spermatozoa normal (%) pada kontrol, ulangan pengamatan ke..										Rata ± SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	84	89	87	90	87	86	85	85	79	87	85,30 a ± 3,284
2	85	85	79	87	86	84	82	89	81	90	
3	89	90	86	80	90	84	90	89	88	86	
4	85	80	86	84	83	86	85	84	79	82	
5	85	89	85	80	80	86	83	90	85	87	
Ulangan	Spermatozoa normal (%) pada perlakuan, ulangan pengamatan ke..										Rata ± SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	29	28	34	24	30	31	26	27	30	34	32,66 b ± 6,186
2	42	36	8	35	36	37	25	41	49	38	
3	29	26	31	27	34	25	28	28	23	34	
4	45	43	39	35	46	34	40	39	32	25	
5	31	29	31	25	35	34	28	27	30	30	

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Krukas-Wallis

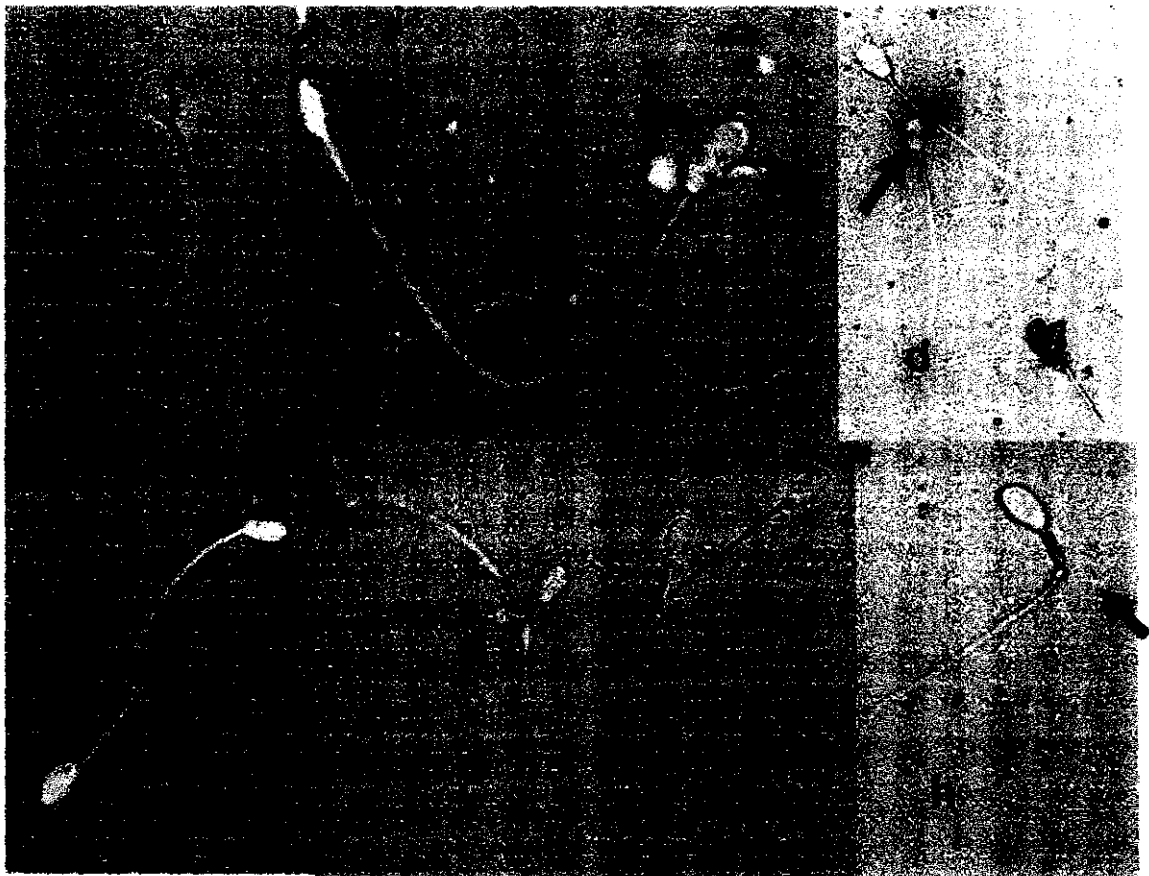
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa imunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa menyebabkan kecacatan spermatozoa sebesar 67,34% (Tabel 5.8). Menurut Anil *et al.* (2007), jantan yang divasektomi dapat mempengaruhi morfologi sperma seperti kepala yang membesar (28-33%), sedangkan yang non-vasektomi kurang dari 2%.

Tabel 5.8 Persentase morfologi spermatozoa abnormal (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan, serta analisis statistik

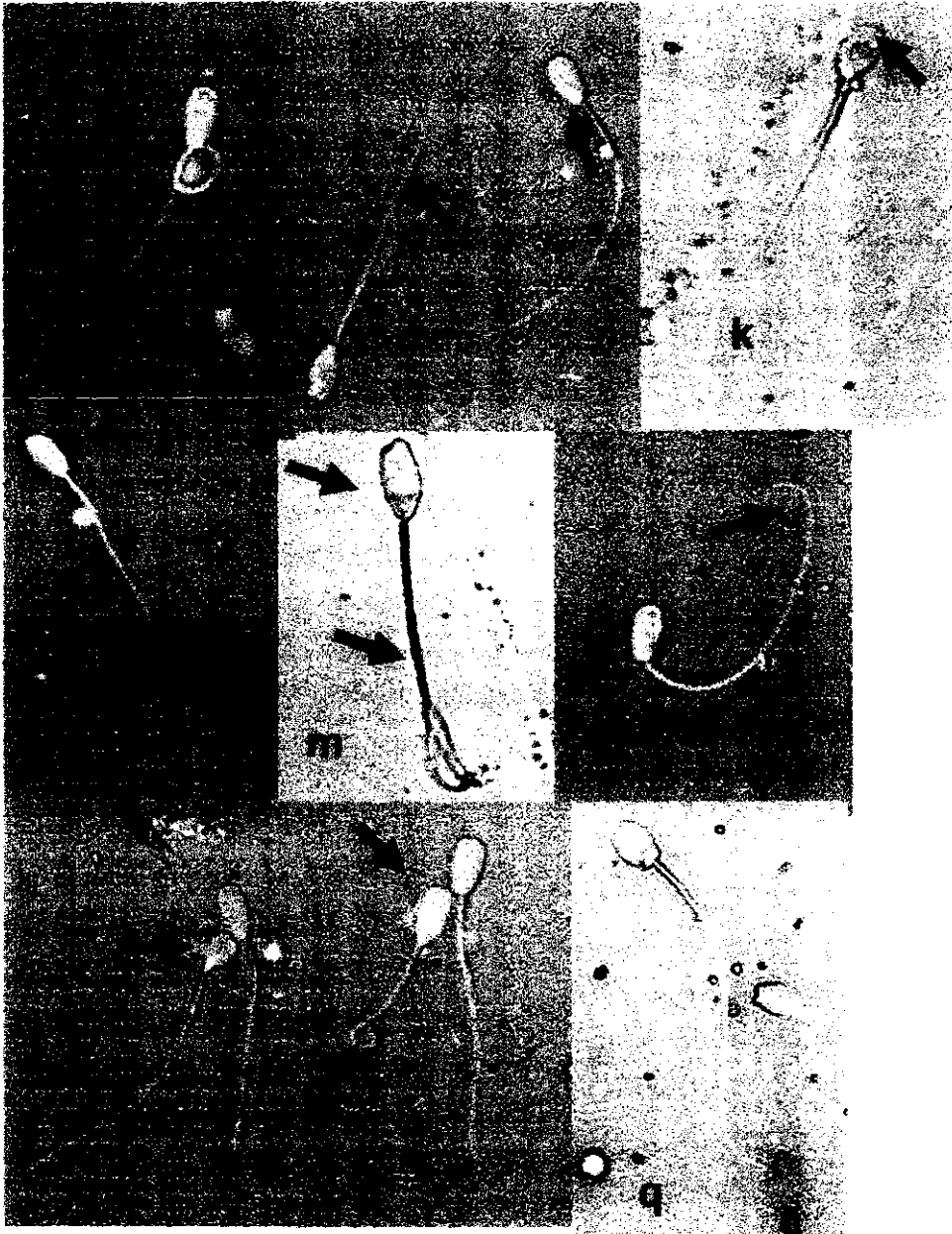
Ulangan	Morfologi spermatozoa (%) abnormal kontrol pada ulangan pengamatan ke..										Rata ± SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	16	11	13	10	13	14	15	15	21	13	14,74 a ± 3,250
2	15	15	21	13	14	16	18	11	19	10	
3	11	10	14	20	10	16	10	11	12	14	
4	15	20	14	16	17	14	15	16	21	18	
5	15	11	15	20	20	14	17	10	15	13	
Ulangan	Morfologi spermatozoa (%) abnormal perlakuan pada ulangan pengamatan ke..										Rata ± SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	71	72	66	76	70	69	74	73	70	66	67,3 b ± 6,186
2	58	64	62	65	64	63	75	59	51	62	
3	71	74	69	73	66	75	72	72	77	66	
4	55	57	61	65	54	66	60	61	68	75	
5	69	71	69	75	65	66	72	73	70	70	

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Krukas-Wallis

Beberapa perubahan morfologi dapat dilihat pada Gambar 5.9 dan 5.10.



Gambar 5.9 Morfologi spermatozoa kelinci normal dan tidak normal (anak panah). (a) normal; (b) *microhead*; (c) kepala memanjang; (d)-(e) kepala salah bentuk; (f) leher patah; (g) kepala asimetri dengan leher; (h) ekor bengkok.



Gambar 5.10 Morfologi spermatozoa kelinci normal dan tidak normal (anak panah).; (i) ekor menggulung; (j,l) sitoplasmik droplet pada *middle piece*; (k) sitoplasmik droplet pada *connecting piece*; (m) kepala salah bentuk, *middle piece* besar, ekor bercabang; (n) kepala asimetri dengan leher, ekor menggulung; (o) kepala salah bentuk, ekor patah dan menggulung; (p) kepala salah bentuk, ekor menggulung; (q) normal.

### 5.3. Pengaruh antibodi pada penghambatan spermatozoa *in-vivo* melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa persentase oosit terfertilisasi pada kontrol berbeda secara signifikan dengan persentase oosit terfertilisasi dari perlakuan

dengan  $P < 0,05$  (Tabel 5.9). Adanya antibodi terhadap protein membran spermatozoa mengganggu interaksi sperma-oosit. Gangguan tersebut diduga karena antibodi mengaglutinasi spermatozoa sehingga motilitas terganggu dan spermatozoa kurang mampu membuahi ovum.

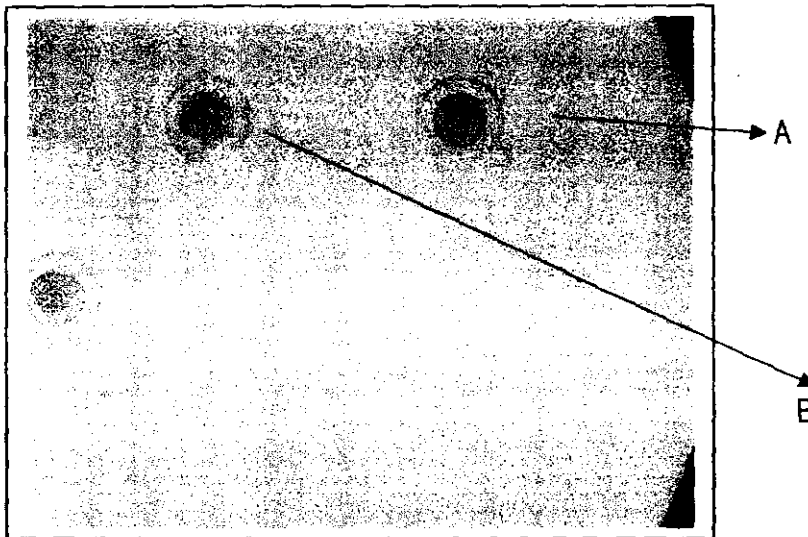
Tabel 5.9 Persentase oosit terfertilisasi dan tidak terfertilisasi (%) pada kelinci kontrol dan perlakuan

Ulangan	Ulangan pengamatan	Persentase oosit (%)			
		Kontrol (K)		Perlakuan (P)	
		Tertifertilisasi	Tidak terfertilisasi	Tertifertilisasi	Tidak terfertilisasi
1	1	100	0	10	90
	2	100	0	0	100
	3	90	10	0	100
2	1	100	0	0	100
	2	100	0	20	80
	3	100	0	0	100
3	1	100	0	0	100
	2	100	0	0	100
	3	100	0	0	100
4	1	100	0	10	90
	2	90	10	0	100
	3	100	0	10	90
5	1	100	0	0	100
	2	100	0	30	70
	3	90	10	0	100
Rata-rata		98,00 <b>a</b>		5,33 <b>b</b>	

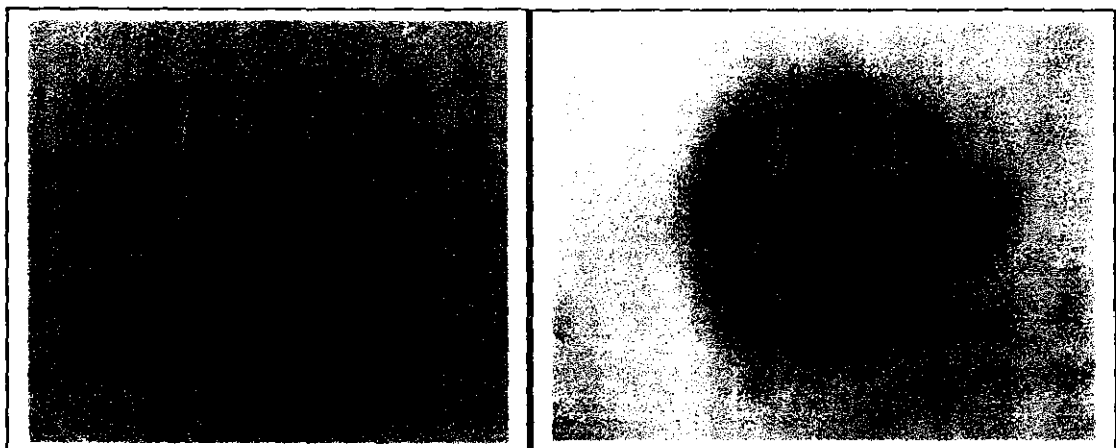
Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Kruskal-Wallis

Menurut Domagala dan Kurpisz (2004), adanya antibodi dalam darah dan saluran reproduksi mempengaruhi stadium pre-fertilisasi antara lain aglutinasi dan atau immobilisasi spermatozoa, mempengaruhi interaksi spermatozoa-oosit dan dapat

menghambat perkembangan zigot post-fertilisasi. Hasil telur yang terfertilisasi dan telur tidak terfertilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.11 dan 5.12.



Gambar 5.11. Oosit yang terfertilisasi dan oosit yang sudah terfertilisasi. A. Oosit belum terfertilisasi. B. Oosit terfertilisasi



A

B

Gambar 5.12 Oosit yang terfertilisasi membentuk *polar body* II (A). Oosit belum terfertilisasi (B).

#### 5.4. Pengaruh antibodi pada penghambatan spermatozoa *in-vitro* melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*

a. Titer antibodi kelinci betina setelah imunisasi dengan protein membran spermatozoa

Telah diimunisasi 2 kelinci betina dengan protein membran spermatozoa kelinci.

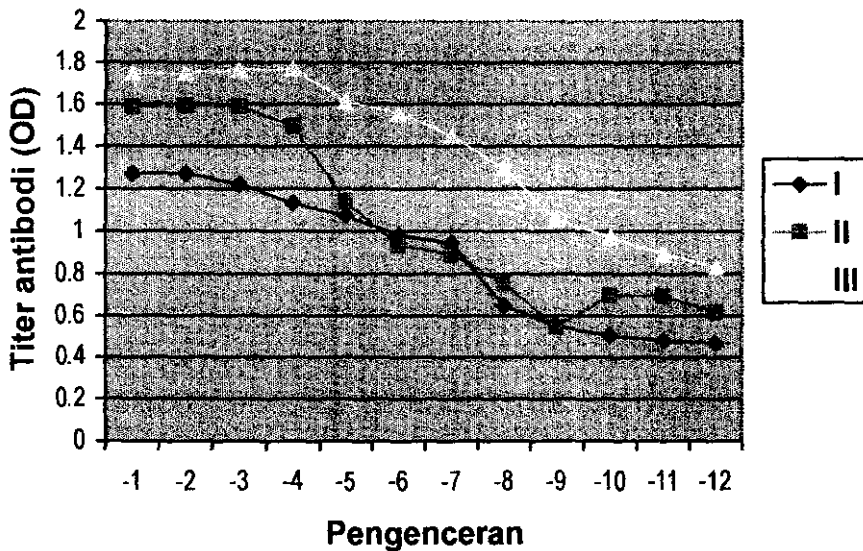
Konsentrasi yang digunakan 200 µg/µl. Metode imunisasi adalah injeksi sub-kutan.

Titer antibodi yang didapatkan dapat dilihat pada tabel 5.10 dan konsentrasi antibodi setelah imunisasi III pada tabel 5.11.

Tabel 5.10 Titer antibodi setelah imunisasi I, II, dan III pada kelinci betina

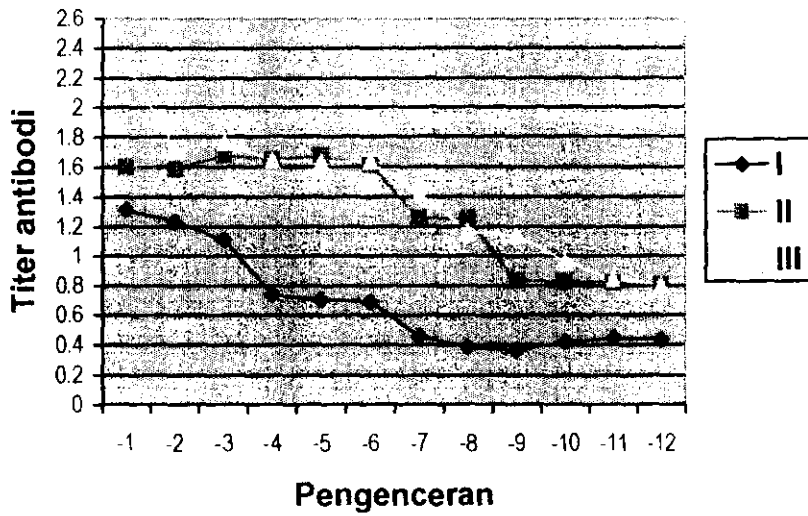
Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,540	0,505	0,466	0,382	0,342	0,321	0,315	0,278	0,260	0,263	0,267	0,256
P1-I	1,271	<b>1,272</b>	1,224	1,135	<b>1,075</b>	0,983	0,945	0,649	0,552	0,506	0,483	0,469
P-2-I	<b>1,313</b>	1,237	<b>1,113</b>	0,736	0,705	0,690	0,455	0,388	0,364	0,418	0,446	0,439
P-1-II	1,585	<b>1,591</b>	1,589	1,495	<b>1,141</b>	0,935	0,892	0,757	0,546	0,698	0,694	0,618
P-2-II	1,602	1,587	<b>1,678</b>	1,650	1,672	1,608	1,257	<b>1,252</b>	0,832	0,829	0,820	0,805
P-1-III	1,746	1,746	1,765	<b>1,771</b>	1,613	1,556	1,452	1,295	<b>1,057</b>	0,973	0,895	0,833
P-2-III	<b>2,306</b>	1,718	1,764	1,646	1,630	1,633	1,420	1,169	<b>1,143</b>	0,965	0,841	0,806

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = perlakuan, 1-2 = ulangan percobaan, I, II, III = waktu imunisasi (pertama, kedua, ketiga)

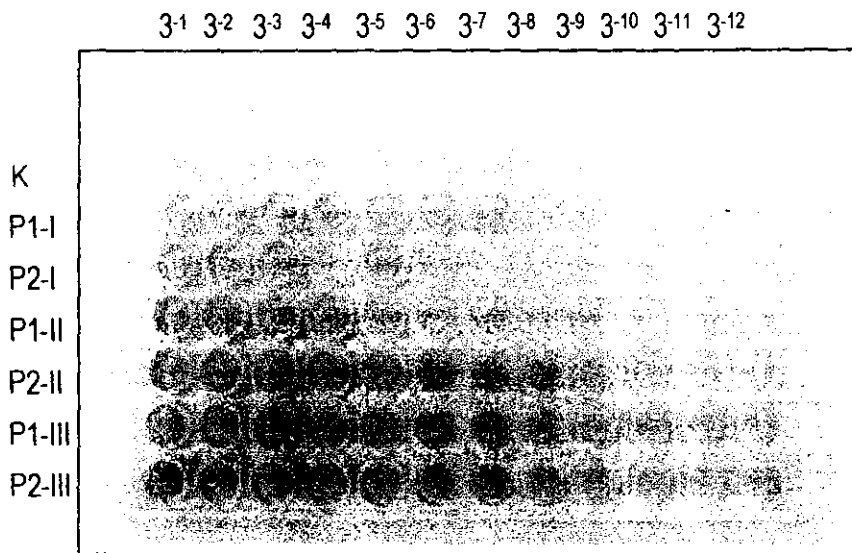


Gambar 5.13 Titer antibodi kelinci betina 1 (P-1) setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran

Berdasarkan hasil pengukuran titer antibodi pada kelinci betina menunjukkan bahwa semakin sering diimunisasi semakin tinggi nilai *optical density*. Titer antibodi tertinggi setelah imunisasi III. Kelinci betina diimunisasi dengan protein membran spermatozoa dimaksudkan untuk produksi antibodi. Selanjutnya, antibodi digunakan untuk inkubasi spermatozoa sebelum fertilisasi *in-vitro*.



Gambar 5.14 Titer antibodi kelinci betina 2 (P-2) setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran



Gambar 5.15 Titer antibodi kelinci betina setelah imunisasi I, II, dan III pada berbagai pengenceran

b. Konsentrasi antibodi kelinci betina setelah imunisasi protein membran spermatozoa

Hasil pengukuran antibodi dengan cara *Bio-Rad Protein Assay* dapat dilihat pada tabel 5.11. Antibodi dibuat berbagai konsentrasi 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5, dan 10 ( $\mu\text{g/ml}$ ) untuk penghambatan spermatozoa secara *in-vitro*.

Tabel 5.11 Konsentrasi antibodi setelah imunisasi III pada kelinci betina

Hewan coba	Konsentrasi protein antibodi ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
1	9,305
2	9,324
Rata-rata	9,3145

### C. Hasil fertilisasi *in-vitro*

Hasil analisis penghambatan spermatozoa *in-vitro* pada kemampuan fertilisasi *in-vitro* dengan uji Anava menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ) sehingga analisis dilanjutkan dengan uji LSD. Jika kemampuan sperma membuahi sel telur antara inkubasi sperma pada konsentrasi 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; dan 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  diperbandingkan, maka didapatkan bahwa sperma yang tidak diinkubasi 98,33% mampu mengadakan fertilisasi berbeda nyata secara signifikan dengan konsentrasi 0,625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (63,33 %), 1,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (33,33 %), 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (13,33%), 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (6,67%) dan 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (3,33 %). Antara konsentrasi 5 dan 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  berbeda tetapi tidak signifikan secara statistik (Tabel 5.12).

Hasil penelitian didukung oleh Rajeev dan Reddy (2004), bahwa spermatozoa manusia yang diinkubasi dengan antibodi konsentrasi 0,325 – 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  menurunkan zona binding terhadap oosit hamnster. Lebih dari 90% oosit tidak terfertilisasi pada inkubasi antibodi 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Hasil penelitian Samuel *et al.* (2000) juga menunjukkan bahwa spema mencit yang diinkubasi dengan antibodi BS-17 dan sperma ditanam dalam oviduk mencit betina terovulasi terjadi reduksi fertilisasi jika dibandingkan dengan kontrol. Antibodi BS-17 menghilangkan kemampuan fertilisasi sperma mencit untuk membuahi telur. Antibodi poliklonal EP-20 menyebabkan immobilisasi dan aglutinasi



sperma manusia secara *in-vitro*, dan menghambat penetrasi sperma pada telur hamster bebas zona.

Tabel 5.12 Pengaruh konsentrasi antibodi pada fertilisasi kelinci kontrol dan perlakuan

Ulangan	Persentase telur terfertilisasi (%) pada berbagai konsentrasi antibodi ( $\mu\text{g/ml}$ )					
	0	0,625	1,25	2,5	5	10
1	100	60	40	10	10	0
2	100	60	30	20	10	10
3	90	70	40	10	0	0
4	100	60	30	10	10	10
5	100	70	30	10	0	0
6	100	60	30	20	10	0
Rata-rata	98,33 a $\pm$ 4,08	63,33 b $\pm$ 5,16	33,33 c $\pm$ 5,16	13,33 d $\pm$ 5,16	6,67 e $\pm$ 5,16	3,33 e $\pm$ 5,16

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  dari uji Anava dan LSD

## BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

### 6.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a) Lama waktu imunisasi berpengaruh pada titer antibodi terhadap spermatozoa pada kelinci jantan. Titer antibodi tertinggi terjadi setelah imunisasi ke-3.
- b) Antibodi terhadap spermatozoa mampu menurunkan motilitas dan menyebabkan morfologi spermatozoa abnormal.
- c) Spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vivo* menurunkan fertilitas yang diamati melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*.
- d) Spermatozoa yang telah dihambat secara *in-vitro* menurunkan fertilitas yang diamati melalui pengamatan fertilisasi *in-vitro*.

### 6.2. SARAN

Mengingat, bahwa protein membran spermatozoa kelinci dapat menghambat spermatozoa baik secara *in-vivo* dan *in-vitro* sehingga menghambat terjadinya fertilisasi *in-vitro*, maka protein membran berpotensi sebagai kandidat antigen atau vaksin kontrasepsi. Penelitian lanjutan masih diperlukan untuk mencari protein membran spermatozoa spesifik yang berpotensi dalam penghambatan spermatozoa baik secara *in-vitro* maupun *in-vivo*

## DAFTAR PUSTAKA

- Alexander, N.J. dan Anderson, D.J. (1987) Immunology of Semen. *Fertility and Sterility*, 47 (2): 192-205.
- Alexander, N.J. dan Bialy, G. (1994) Contraceptive Vaccine Development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 6(3): 273 – 280.
- Anil, K.S., Bhalla, S.A., Sarda, N., Pal, P.C., Salhan, S. (2007) Effect Of Primary Obstructive Infertility On Sperm Morphology. *The Internet Journal of Urology*. 2007. Volume 4 Number 2.
- Anonimus (2005) *Pedoman Imunisasi di Indonesia*, edisi 2. Badan Penerbit Pengurus Pusat Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Anonimus (2006) Isu Gender, Klien dan Pemberi Pelayanan dalam KB-KR. Gema Pria. <http://pikas.bkkbn.go.id/gemapria/article-detail.php>, diakses tanggal 27 September 2007.
- Anonimus<sup>a</sup> (2007) The Transmembrane Receptor. [http://en.wikipedia.org/wiki/the\\_transmembrane\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/the_transmembrane_receptor).
- Anonimus<sup>b</sup> (2007) Rabbit sperm membrane protein. <http://ca.expasy.org/>.
- Anonimus (2008) Serba Serbi Kontrasepsi. <http://www.medicastore.com/oc/serbaserbi.htm>, diakses tanggal 3 Januari 2008.
- Arunima, M., Mishra, K.P., dan Majumder, G.C. (2004) Identification of goat sperm ecto-cyclic AMP independent protein kinase substrate localized on sperm outer surface. *Journal of Cellular Biochemistry*, 92(1): 164-177.
- Austin, C.R. dan Shorts, R.V. (1985) *Embryonic and Fetal Development*. Cambridge University Press.
- Austyn, J.N. dan Wood, K.J. (1994) *Principle of Cellular and Molecular Immunology*. Oxford: Oxford University Press.
- Bellanti, J.A. (1993) *Immunologi III*. Terjemahan A. S. Wahab. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Bohring, C., Krause, E., Habermann, B. dan Krause, W. (2001) Testis and Spermatogenesis. Isolation and Identification of Sperm Membrane Antigens Recognized by Antisperm Antibodies, and Their Possible Role in Immunological Infertility Disease. *Molecular Human Reproduction*, 7(2): 113 - 118.

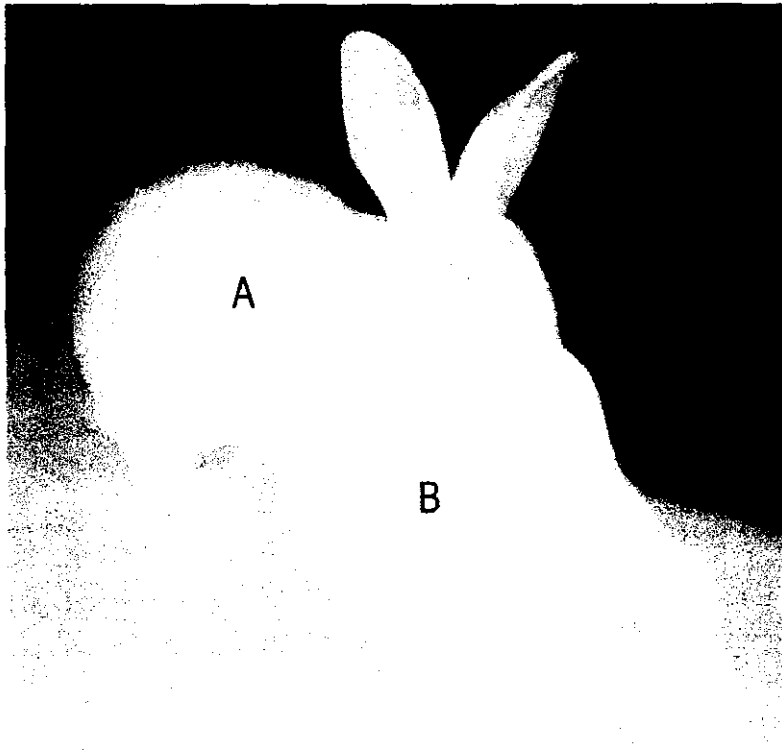
- Bohring, C. dan Krause, W. (2003) Immune Infertility: Towards a Better Understanding of Sperm (Auto)-Immunity. The Value of Proteomic Analysis. *Human Reproduction*, 18(5): 915 – 924.
- Bouchard, M.J., Dong, Y., McDermott, B.M., Lam, D.H., Brown, K. R., Shelanski, M., Bellvé, A.R., dan Racaniello, V. R. (2000) Defects in Nuclear and Cytoskeletal Morphology and Mitochondrial Localization in Spermatozoa of Mice Lacking Nectin-2, a Component of Cell-Cell Adherens Junctions. *Molecular and Cellular Biology*, 20(8): 2865-2873.
- Breed, W.G., Idriss, D., dan Oko, R.J. (2000) Protein Composition of The Ventral Processes on The Sperm Head of Australian Hydromyine Rodents, *Biology of Reproduction*, 63: 629-634.
- Campbell, N.A., Jane, B.R., dan Lawrence, G.M. (2004) *Biology*, edisi ke lima, Jilid III. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Chitra, K.C, Sudjatha, R., Latchoumycandane, C., dan Marthur, P.P. (2001) Effect of Lindane on Antioxidant Enzymes in Epididymis and Epididymal Sperm of Adult Rats. *Asian Journal of Andrology*, 3: 205 -208.
- Cooper, T.G. dan Yeung, C.H. (2006) Sperm maturation in the human epididymis. *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Edited by Christopher J. De Jonge and Christopher L. R. Barratt. Cambridge University Press.
- Domagala, A. dan Kurpisz, M. (2004) Identification of Sperm Immunoreactive Antigens for Immunocontraceptive Purposes: A Review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 11-18.
- Gao Z., dan Garbers, D.L. (1998) Species Diversity in The Structure of Zonadhesin, a Sperm-specific Membrane Protein Containing Multiple Cell Adhesion Molecule-like Domains, *Journal of Biology Chemistry*, 273: 3415-3421.
- Gaudreault, C., Alfy, M. E., Legare, C., dan Sullivan, R. (2001) Expression of the hamster Sperm Protein P26H During Spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 65: 79-86.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J., dan Osborne, B.A. (2000) *Kuby Immunology*, edisi 4. W.H. Freeman and Company, New York.
- Gordon, I. (1994) *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge University Press.

- Goyal, H.O., Braden, T.D., Mansour, M., William, C.S., Kamaleldin, A., dan Srivastava, K.K.. (2001) Diethylstilbestrol-Treated Adult Rats with Altered Epididymal Sperm Numbers and Sperm Motility Parameter but Without Alteration in Sperm Production and Sperm Morphology. *Biology of Reproduction*, 64: 927-934.
- Grudzinskas, J.G. dan Yovich, J.L. (1995) *Gametes The Spermatozoon*. Cambridge University Press, Melbourne.
- Guyton, A.C. (1995) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*, edisi 7, bagian 1. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Guyton, A.C., dan Hall, J.E. (1997) *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Textbook of Medicinal Physiology)*, alih bahasa oleh Setiawan, I., Tengadi, K. A., dan Santoso. Edisi 9. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Griffin, P.D. dan Jones, W.R. (1991) Contraceptive Vaccines. *Stat. Medicine* 10: 177-190.
- Hafez, E.S.E. (2000) *Reproduction in Farm Animals*, 7<sup>th</sup> edition. Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Hafez, E. S. E., dan Hafez, S. D. (2005) *Atlas of Clinical Andrology*. Taylor and Francis Group. United States.
- Haila, A.A. dan Daulat, R.P.T. (2001) Acid Glycohydrolases in Rat Spermatozoa, Spermatids, and Spermatozoa: Enzyme Activities, Biosynthesis and Immunolocalization. *Biological Procedures Online*, 3: 35-42.
- Hamamah, S., Royere, D., Jean, M., Lucas, H., Barthelemy, C., Bariere, P., dan Lansac, J. (1997) The Future of Male Contraception by Preventing Gamete Interaction. *Contraceptive, Fertility and Sex*, 25(2): 311-24.
- Hao Z., Michael, J.W., Jagathpala, S., Kenneth, K., Laura, B., Buer, S., Anne, W., Scott, C., Charles, J.F., dan John, C.H. (2002) SAMP32, a Testis-Specific, Isoantigenic Sperm Acrosomal Membrane-Associated Protein. *Biology of Reproduction*, 66: 735-744.
- Hayati, A. (2007) Kajian Kualitas dan Protein Membran Spermatozoa Tikus (*Rattus norvegicus*) Akibat Pemaparan 2-Methoxyethanol. *Disertasi*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Hercowitz, H.B. (1993) Immunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi. *Dalam Bellanti, J. A. (Eds) Immunologi III*. Terjemahan A. S. Wahab. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Hess, R.A. (2000) Effects of Environmental Toxicants on The Efferent Duct, Epididymis and Fertility. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 53:247-259.
- Isnaeni, W. (2006) *Fisiologi Hewan*. Penerbit: Kanisius, Yogyakarta.
- Kresno, S.B. (2001) *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*, edisi 4. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Lea, I.A. (1998) Immune Response to Immunization with Sperm Antigens in The Macaque Oviduct. *Biology of Reproduction*, 58 (3): 794-800.
- Lenzi, A., Gandini, L., Maresca, V., Rago, R., Sgro, P., Dondero, F., dan Picardo, M. (2000) Fatty Acid Composition of Spermatozoa and Immature germ Cells. *Molecular Human Reproduction*, 6 (3): 226-231.
- Luconi M., Monica, M., Gianni, F., dan Elisabetta, B. (1999) Identification and Characterization of a Novel Functional Estrogen Receptor on Human Sperm Membrane that Interferes with Progesterone Effects. *Journal Clinicals Endocrinology and Metabolism*, 84(5):1670-1678.
- Naz, R.K. (1996) Application of Sperm Antigen in Immunocontraception. *Frontier in Bioscience* 1, e87-95, September 1, 1996. <http://www.bioscience.org/1996/v1/e/Nas1/htmls/2/htm>.
- Naz, R.K. dan Vanek, C.M. (1998) Spermatozoa-Specific Protein and Their Role in Contraceptive Development. *Bioscience* 1, e39-48, 30 April 1998. <http://www.bioscience.org/1998/v1/e/Nas1/htmls/2/htm>.
- Nossal, G.J.V. (1993) Life Death and the Immun System. In: *Life, Death and the Immun System*. *Scientific American*. 269 (3): 21-30.
- Pereira, B.M.J., Aida, A.H., dan Daulat, R.P.T. (1998) Rat Sperm Surface Mannosidase is First Expressed on The Plasma Membrane of Testicular Germ Cells, *Biology of Reproduction*, 59: 1288-1295.
- Primakoff, P., Woolman-Gamer, L., Tung, K.S., dan Myles, D.G. (1997) Reversible Contraceptive Effect of PH-20 Immunization in Male Guinea Pigs. *Biology of Reproduction*, 56:1142-1146.
- Rajeev S.K. dan Reddy, K.V.R. (2004) Sperm Membrane Protein Profiles of Fertile and Infertile Men: Identification and Characterization of Fertility-Associated Sperm Antigen. *Human Reproduction*, 19(2): 234-242.

- Reisse, S., Rothardt, G., Volkl, A., dan Beier, K. (2001) Peroxisome and Either Lipid Biosynthesis in Rat Testis and Epididymis. *Journal of Biology Reproduction*, 64:1689-1694.
- Rugh, R. (1986) *The Mouse: Its Reproduction and Development*. Burgess Publishing Company, Mineapolis.
- Sacco, A.G. dan Shivers, C.A. (1978) Immunologic Inhibition of Development. Dalam *Methods in Mammalian Reproduction* by Daniel, J.C. Academic Press, Inc, London, 203-228.
- Samuel, S.K., Wang, L., dan Kamada, M. (2000) Antisperm Antibodies Associated with Infertility: Properties and Encoding Genes of Target Antigens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 224:123-132.
- Siswono (2001) Biologi Protein. <http://id.www.gizi.net>.
- Suri, A. (2005) Sperm-Based Contraceptive Vaccines: Current Status, Merits and Development. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7: 1-16.
- Taylor, P. (1986) *Practical Teratology*. Academic Press, London.
- Wahyuningsih, SPA., L. Suhargo, dan Kushendarsasi (2004) Efek Ekstrak Testis terhadap Jumlah Implantasi dan Jumlah Anak pada Mencit (*Mus musculus*). *Berkala Penelitian Hayati*, PBI Cabang Jawa Timur, 10(1):67-70.
- Wahyuningsih, SPA. (2005) Efek Ekstrak Testis terhadap Angka Kebuntingan. *Seminar Nasional Biologi II*, 23 Juli 2005. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Wahyuningsih, SPA. (2006) Kondisi Siklus Birahi Akibat Imunisasi dengan Ekstrak Testis. *Seminar Basic Science 3*, 25 Pebruari 2006. Universitas Brawijaya, Malang.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C. dan Aitken, J. (2001) Analysis of Reactive Oxygen Species Generating System in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65: 1102-1113.
- Yatim, W. (1994) *Reproduksi dan Embriologi untuk Mahasiswa Biologi dan Kedokteran*. Penerbit Tarsito, Bandung.
- Zanich, A., Pascall, J.C. dan Jones, R. (2003) Secreted Epididymal Glycoprotein 2D6 that Bind to the Sperms Plasma Membrane is a Membrane of The  $\beta$ -Defensin Superfamily of Pore-Forming Glycopeptides. *Journal of Biology Reproduction*, 69:1831-1842.

**LAMPIRAN 1. Kelinci jantan yang digunakan dalam penelitian**



Kelinci yang digunakan dalam penelitian. (A) kelinci betina dan (B) kelinci jantan.



## LAMPIRAN 2. Analisis statistik titer antibodi

### Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
optical density * waktu imunisasi	20	100,0%	0	,0%	20	100,0%

### Report

#### optical density

waktu imunisasi	Mean	Std. Deviation
pre-imun	,65160	,199781
imun 1	1,49020	,095135
imun 2	1,77720	,052409
imun 3	1,85320	,148012
Total	1,44305	,504555

## NPar Tests

### Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
optical density	20	1,44305	,504555	,443	2,110

### One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		optical density
N		20
Normal Parameters(a,b)	Mean	1,44305
	Std. Deviation	,504555
Most Extreme Differences	Absolute	,212
	Positive	,172
	Negative	-,212
Kolmogorov-Smirnov Z		,948
Asymp. Sig. (2-tailed)		,329

a Test distribution is Normal.

b Calculated from data.

## Oneway

### Test of Homogeneity of Variances

#### optical density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,702	3	16	,207

# ANOVA

optical density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4,542	3	1,514	82,272	,000
Within Groups	,294	16	,018		
Total	4,837	19			

## Multiple Comparisons

Dependent Variable: optical density

LSD

(I) waktu imunisasi	(J) waktu imunisasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
pre-imun	imun 1	-,838600(*)	,085801	,000	-1,02049	-,65671
	imun 2	-1,125600(*)	,085801	,000	-1,30749	-,94371
	imun 3	-1,201600(*)	,085801	,000	-1,38349	-1,01971
imun 1	pre-imun	,838600(*)	,085801	,000	,65671	1,02049
	imun 2	-,287000(*)	,085801	,004	-,46889	-,10511
	imun 3	-,363000(*)	,085801	,001	-,54489	-,18111
imun 2	pre-imun	1,125600(*)	,085801	,000	,94371	1,30749
	imun 1	,287000(*)	,085801	,004	,10511	,46889
	imun 3	-,076000	,085801	,389	-,25789	,10589
imun 3	pre-imun	1,201600(*)	,085801	,000	1,01971	1,38349
	imun 1	,363000(*)	,085801	,001	,18111	,54489
	imun 2	,076000	,085801	,389	-,10589	,25789

\* The mean difference is significant at the .05 level.

### LAMPIRAN 3. Analisis statistik kecepatan motilitas spermatozoa

#### Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
motilitas * pengaruh antibodi	100	100,0%	0	,0%	100	100,0%

#### Report

##### motilitas

pengaruh antibodi	Mean	Std. Deviation
kontrol	56,48900	8,321380
perlakuan	10,28350	3,518024
Total	33,38625	24,073368

#### NPar Tests

##### Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

##### Frequencies

	1. KONRTOL 2 PERLAKUAN	N
MOTILITAS SPERMA 1		50
2		50
Total		100

##### Test Statistics<sup>a</sup>

		MOTILITAS SPERMA
Most Extreme Differences	Absolute	1.000
	Positive	.000
	Negative	-1.000
	Kolmogorov-Smirnov Z	5.000
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Grouping Variable: 1. KONRTOL 2 PERLAKUAN

#### Kruskal-Wallis Test

##### Ranks

	pengaruh antibodi	N	Mean Rank
motilitas	kontrol	50	75,50
	perlakuan	50	25,50
	Total	100	

##### Test Statistics(a,b)

	motilitas
Chi-Square	74,258
df	1
Asymp. Sig.	,000

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: pengaruh antibodi

## LAMPIRAN 4. Analisis statistik morfologi spermatozoa normal

### Case Processing Summary

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MORFOLOGI NORMAL * KONTROL/VARIABEL	100	99.0%	1	1.0%	101	100.0%

### Report

#### MORFOLOGI NORMAL

KONTROL/VARIABEL	Mean	N	Std. Deviation	Variance	Sum
1	85.30	50	3.284	10.786	4265
2	32.66	50	6.186	38.270	1633
Total	58.98	100	26.908	724.020	5898

### NPar Tests

#### Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

##### Frequencies

KONTROL/VARIABEL	N
MORFOLOGI NORMAL 1	50
2	50
Total	100

##### Test Statistics<sup>a</sup>

		MORFOLOGI NORMAL
Most Extreme Differences	Absolute	1.000
	Positive	.000
	Negative	-1.000
	Kolmogorov-Smirnov Z	5.000
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Grouping Variable: KONTROL/VARIABEL

### Kruskal-Wallis Test

##### Ranks

KONTROL/VARIABEL	N	Mean Rank
MORFOLOGI NORMAL 1	50	75.50
2	50	25.50
Total	100	

##### Test Statistics<sup>a,b</sup>

MORFOLOGI NORMAL	
Chi-Square	74.428
df	1
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:  
KONTROL/VARIABEL

**LAMPIRAN 5. Analisis statistik telur terfertilisasi pada penghambatan sperma *in-vivo***

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
presen fertilisasi * 1. kontrol 2. perlakuan	30	100.0%	0	.0%	30	100.0%

**Report**

presen fertilisasi

1. kontrol 2. perlakuan	Mean	N	Std. Deviation
1	98.00	15	4.140
2	5.33	15	9.155
Total	51.67	30	47.640

**Two-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

**Frequencies**

	1. kontrol 2. perlakuan	N
presen fertilisasi	1	15
	2	15
	Total	30

**Test Statistics<sup>a</sup>**

		presen fertilisasi
Most Extreme Differences	Absolute	1.000
	Positive	.000
	Negative	-1.000
	Kolmogorov-Smirnov Z	2.739
	Asymp. Sig. (2-tailed)	.000

a. Grouping Variable: 1. kontrol 2. perlakuan

**Kruskal-Wallis Test**

**Ranks**

	1. kontrol 2. perlakuan	N	Mean Rank
presen fertilisasi	1	15	23.00
	2	15	8.00
	Total	30	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	presen fertilisasi
Chi-Square	24.250
df	1
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: 1. kontrol 2. perlakuan

**LAMPIRAN 6.** Analisis statistik telur terfertilisasi pada penghambatan sperma *in-vitro*

**Case Processing Summary**

	Cases					
	Included		Excluded		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
persen telur terfertilisasi * konsentrasi Ab	36	100.0%	0	.0%	36	100.0%

**Report**

persen telur terfertilisasi

konsent rasi Ab	Mean	N	Std. Deviation
1	98.33333	6	4.082483
2	63.33333	6	5.163978
3	33.33333	6	5.163978
4	13.33333	6	5.163978
5	6.66667	6	5.163978
6	3.33333	6	5.163978
Total	36.38889	36	35.144825

**NPar Tests**

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		persen telur terfertilisasi
N		36
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	36.38889
	Std. Deviation	35.144825
Most Extreme Differences	Absolute	.218
	Positive	.218
	Negative	-.150
Kolmogorov-Smirnov Z		1.308
Asymp. Sig. (2-tailed)		.065
a. Test distribution is Normal.		

**Oneway**

**Test of Homogeneity of Variances**

persen telur terfertilisasi

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.750	5	30	.593

**ANOVA**

persen telur terfertilisasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	42480.556	5	8496.111	339.844	.000
Within Groups	750.000	30	25.000		
Total	43230.556	35			

# Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

persen telur terfertilisasi  
LSD

(I) konsent rasi Ab	(J) konsent rasi Ab	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	35.000000	2.886751	.000	29.10447	40.89553
	3	65.000000	2.886751	.000	59.10447	70.89553
	4	85.000000	2.886751	.000	79.10447	90.89553
	5	91.666667	2.886751	.000	85.77113	97.56220
	6	95.000000	2.886751	.000	89.10447	100.89553
2	1	-35.000000	2.886751	.000	-40.89553	-29.10447
	3	30.000000	2.886751	.000	24.10447	35.89553
	4	50.000000	2.886751	.000	44.10447	55.89553
	5	56.666667	2.886751	.000	50.77113	62.56220
	6	60.000000	2.886751	.000	54.10447	65.89553
3	1	-65.000000	2.886751	.000	-70.89553	-59.10447
	2	-30.000000	2.886751	.000	-35.89553	-24.10447
	4	20.000000	2.886751	.000	14.10447	25.89553
	5	26.666667	2.886751	.000	20.77113	32.56220
	6	30.000000	2.886751	.000	24.10447	35.89553
4	1	-85.000000	2.886751	.000	-90.89553	-79.10447
	2	-50.000000	2.886751	.000	-55.89553	-44.10447
	3	-20.000000	2.886751	.000	-25.89553	-14.10447
	5	6.666667	2.886751	.028	.77113	12.56220
	6	10.000000	2.886751	.002	4.10447	15.89553
5	1	-91.666667	2.886751	.000	-97.56220	-85.77113
	2	-56.666667	2.886751	.000	-62.56220	-50.77113
	3	-26.666667	2.886751	.000	-32.56220	-20.77113
	4	-6.666667	2.886751	.028	-12.56220	-.77113
	6	3.333333	2.886751	.257	-2.56220	9.22887
6	1	-95.000000	2.886751	.000	-100.89553	-89.10447
	2	-60.000000	2.886751	.000	-65.89553	-54.10447
	3	-30.000000	2.886751	.000	-35.89553	-24.10447
	4	-10.000000	2.886751	.002	-15.89553	-4.10447
	5	-3.333333	2.886751	.257	-9.22887	2.56220

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## B. DRAF ARTIKEL ILMIAH

### TITER ANTIBODI PADA KELINCI (*Oryctolagus cuniculus*) JANTAN SETELAH IMUNISASI DENGAN PROTEIN MEMBRAN SPERMATOZOA

Sri Puji Astuti Wahyuningsih<sup>1)</sup>, Alfiah Hayati<sup>1)</sup>, Imam Mustofa<sup>2)</sup>

1) Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.

2) Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu imunisasi terhadap titer antibodi yang ditunjukkan dengan nilai *optical density* (OD). Penelitian ini menggunakan kelinci jantan dewasa strain lokal. Spermatozoa dikoleksi kauda epididimis dengan cara *flushing*. Selanjutnya, protein membran spermatozoa diisolasi dalam larutan hipototik (10 mM *potassium phosphate buffer*) dengan teknik sentrifugasi. Kelinci diimunisasikan dengan protein membran spermatozoa dosis 200 µg/µl. Imunisasi sebanyak 3 kali dengan selang waktu 21 hari. Titer antibodi diuji dengan ELISA. Kontrol negatif menggunakan kelinci yang diimunisasi tetapi tanpa antigen. Data berupa nilai OD dianalisis dengan anava dan uji LSD. Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi setelah imunisasi II (1,777) dan III (1,853) lebih tinggi daripada setelah imunisasi I (1,490) dan sebelum imunisasi/pre-imun (0,652). Kesimpulan penelitian adalah lama waktu imunisasi berpengaruh pada titer antibodi.

Kata Kunci : protein membran spermatozoa kelinci, epitop, imunokontrasepsi

#### PENGANTAR

Rata-rata pertumbuhan populasi penduduk dunia sekarang hingga tahun 2050 diperkirakan dapat mencapai 8,9 milyar. Hal ini dapat menimbulkan resiko terjadinya overpopulasi (Suri, 2005). Pengendalian penduduk dengan menggunakan alat kontrasepsi dapat menunda kehamilan, menjarangkan, mengatur jumlah anak, dan menghentikan kehamilan. Di Indonesia, pengendalian penduduk di laksanakan dalam suatu Program Keluarga Berencana (KB).

Di Indonesia, program KB yang ditujukan untuk kaum pria masih jarang. Menurut Anonimus (2006), peserta KB pria baru mencapai 1,3% dari total 58,3% dari seluruh peserta KB. Metode kontrasepsi pria yang telah dilakukan selama ini hanya ada



2 macam, yaitu penggunaan kondom dan vasektomi. Menurut Anonimus (2008), kondom efektif mencegah kehamilan 75 – 80% dan mempunyai kekurangan, yaitu mudah robek bila terkena kuku atau benda tajam, membutuhkan waktu untuk pemasangan, dan mengurangi sensasi seksual. Sedangkan vasektomi efektif mencegah kehamilan secara permanen.

Untuk mengatasi permasalahan tersebut diperlukan strategi kontraseptif yang baru (Suri, 2005). Imunokontrasepsi merupakan alternatif kontrasepsi dengan prinsip imunologis yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigenik dan bertujuan untuk mencegah pertemuan antara spermatozoa dan ovum (Hamamah *et al.*, 1997). Vaksin imunokontrasepsi dapat mengganggu aktivitas reproduksi pria maupun wanita dengan cara memblok penetrasi spermatozoa pada ovum atau mencegah implantasi dan perkembangan telur terfertilisasi (Alexander dan Bialy, 1994).

Sekarang ini banyak dipelajari sifat antigenisitas protein spermatozoa sebagai dasar pengembangan vaksin kontrasepsi (Primakoff *et al.*, 1997). Penggunaan antigen sperma untuk pengembangan vaksin kontrasepsi ditekankan pada spesifitas sperma (hanya bekerja pada gamet), peran pada fertilitas, imunogenisitas yang meliputi pembentukan respon antibodi yang cukup dan mampu menghalangi fertilitas (Naz, 1996). Antigen sperma cukup berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat vaksin kontrasepsi dalam imunokontrasespsi baik imunisasi pada hewan jantan maupun betina (Naz dan Vanek, 1998).

Membran spermatozoa mengandung protein yang bersifat sebagai antigen. Imunisasi dengan protein membran spermatozoa akan menimbulkan respon imun

spesifik dan terbentuk antibodi terhadap protein membran spermatozoa. Reaksi antara antibodi dengan antigen menimbulkan efek konsepsi, seperti aglutinasi spermatozoa, reduksi motilitas, gangguan penetrasi mukus servik, tidak efisiennya fusi spermatozoa dan telur, peningkatan fagositosis spermatozoa dan matinya embrio pre atau pasca implantasi. Semua hambatan tersebut menyebabkan antifertilitas. Menurut Yatim (1994), antigen protein membran spermatozoa berpotensi untuk dikembangkan menjadi vaksin kontrasepsi yang aman, tidak mempunyai pengaruh negatif, murah, mempunyai pengaruh yang tidak permanen, dan mudah menggunakannya.

Antibodi terhadap spermatozoa (*antisperm antibody/ASA*) menyebabkan infertil baik secara spontan maupun buatan (Bohring *et al.*, 2001). *Antisperm antibody* dapat mempengaruhi stadium pre-fertilisasi dan dapat menghambat perkembangan zigot setelah fertilisasi (Domagala dan Kurpisz, 2004). Menurut Bohring *et al.*, (2001), antibodi terhadap antigen spermatozoa dapat dideteksi pada cairan/plasma seminal dan mereka dapat berikatan pada permukaan spermatozoa. *Antisperm antibody* juga dapat dideteksi pada mukus servik, cairan oviduk atau cairan folikel pada wanita. *Antisperm antibody* juga berada dalam serum darah pada wanita dan pria. Menurut Bohring dan Krause (2003), timbulnya ASA pada pria dapat menyebabkan infertilitas.

Naz (1996) menyatakan bahwa imunisasi aktif dengan antigen *lactate dehydrogenase (LDH)-C4* yang diisolasi dari spermatozoa manusia menyebabkan reduksi fertilitas lebih dari 50% pada berbagai spesies. Aktif imunisasi dengan protein *rabbit sperm autoantigen (RSA) family* bereaksi silang dengan sperma manusia dan menghambat penetrasi sperma pada oosit. Penelitian Wahyuningsih (2005) menyatakan bahwa ekstrak testis yang mengandung protein spesifik testis yang

diimunisasikan pada mencit betina menurunkan angka kebuntingan, terutama pada dosis antigen ekstrak testis 2000 µg. Beberapa peneliti menyatakan bahwa pada membran sel spermatozoa terdapat protein 32, 34, 35, 36, 50, 53, 56, dan 57 kDa yang berpartisipasi pada proses fertilisasi.

Menurut Anonimus<sup>a</sup> (2007), beberapa sekuen protein sperma spermatozoa kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang telah diketahui urutannya adalah *sperm membrane protein*, *acrosomal vesicle protein 1*, *sperm surface protein Sp17*, *hyaluronidase PH-20 precursor* (64 kDa), *sperm membrane protein-B*, *A disintegrin and metalloproteinase domain 2 precursor (fertilin subunit beta/PH-30)*, *zonadhesin* (55-57 kDa), *fertilin alpha subunit*, *acrosin* (46 kDa).

Berdasarkan dari latar belakang di atas, maka penelitian ini ingin mengetahui pengaruh imunisasi protein membran spermatozoa kelinci terhadap titer antibodi. Hasil penelitian diharapkan menjadi dasar pembuatan vaksin kontrasepsi terutama vaksin rekombinan yang relatif aman untuk digunakan dalam kontrasepsi masa depan.

## **BAHAN DAN METODE**

Kelinci jantan dan betina strain lokal, berumur 1,5 tahun, berat badan 1,4-1,8 kg, *Freund's complete adjuvant* (FCA) dan *Freund's incomplete adjuvant* (FICA), *phosphate buffer saline* (PBS), bahan untuk ELISA: *Protein Detector ELISA Kit* yang terdiri dari *coating buffer*, *BSA dilution/blocking solution*, *wash solution*, *50% glycerol*, *2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonate/ABTS)* *substrate solution*, *peroxidase solution*, *peroxidase stop solution*, *peroxidase-labeled antibody (horseradish peroxidase/HRP goat anti-rabbit IgG)*.

### 1. Koleksi spermatozoa dan isolasi protein membran spermatozoa

Kelinci jantan diambil kauda epididimis untuk diisolasi spermatozoanya. Isolasi protein membran spermatozoa kelinci mengacu pada Bohring *et al.* (2001), Chitra *et al.* (2001), Rajeev dan Reddy (2004), serta Vernet *et al.* (2001).

### 2. Imunisasi kelinci

Lima ekor kelinci jantan diimunisasi dengan protein membran spermatozoa untuk pengamatan titer antibodi dan kualitas spermatozoa. Satu ekor kelinci jantan diimunisasi tanpa antigen digunakan sebagai kontrol negatif.

Pada imunisasi pertama, protein membran spermatozoa (antigen) 200 µg/ml diemulsikan dengan garam fisiologis sampai volume 0,1 ml dan *freund's complete adjuvant* (FCA) 0,1 ml (perbandingan 1:1), kemudian di vortex selama 1 jam. Ada dua lokasi penyuntikan masing-masing 0,1 ml di subkutan leher. Pada imunisasi kedua dilakukan setelah 21 hari berikutnya dengan campuran antigen dalam garam fisiologis dan *freund's incomplete adjuvant* (FICA) 0,1 mL dengan perbandingan 1:1. Pada imunisasi ketiga setelah 21 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti imunisasi kedua. Sedangkan untuk kontrol, hewan coba diimunisasi seperti di atas, tetapi tanpa antigen.

### 3. Pengambilan serum

Darah diambil dari *vena auricularia*. Darah ditampung dalam *Eppendorf*, dibiarkan pada suhu 4°C, selama 24 jam. Selanjutnya, darah di sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm, selama 10 menit, suhu 4 °C. Serum dikoleksi untuk pengukuran titer antibodi.

#### 4. Pengukuran titer antibodi dengan ELISA

Titer antibodi diukur dengan cara *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Setiap sumuran dari ELISA *plate* diisi 100  $\mu$ l larutan antigen protein spermatozoa dengan konsentrasi 5  $\mu$ g/ml dalam *coating buffer* dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Cawan mikrotiter dikosongkan dan pada setiap sumuran ditambahkan 200  $\mu$ l larutan *blocking* (BSA 1%). Selanjutnya, cawan mikrotiter diinkubasikan pada suhu 37°C selama 10 menit. Cawan mikrotiter dikosongkan dan setiap sumuran diisi 100  $\mu$ l serum mencit yang telah dimunisasi atau serum kontrol. Serum diencerkan secara berseri, yaitu 3<sup>-1</sup>, 3<sup>-2</sup> dan seterusnya sampai 3<sup>-10</sup>. Cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran diisi dengan 100  $\mu$ l larutan konjugat IgG *goat anti rabbit peroxidase* dengan konsentrasi 1  $\mu$ g/ml dalam 50% gliserol dan BSA 1%. Kemudian, cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Cawan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran ditambah substrat ABTS sebanyak 100  $\mu$ l (1 mg/ml dalam bufer substrat dan 0,3  $\mu$ l hidrogen peroksida). Cawan ditutup aluminium foil dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 5 menit. Jika sudah timbul warna, maka cawan diberi larutan penghenti (*stop solution*). Selanjutnya, titer antibodi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

#### 5. Analisis Data

Data titer antibodi kelinci jantan dianalisis dengan Anava. Bila ada beda nyata dilanjutkan dengan uji LSD. Analisis data menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) 16.00 for Windows.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

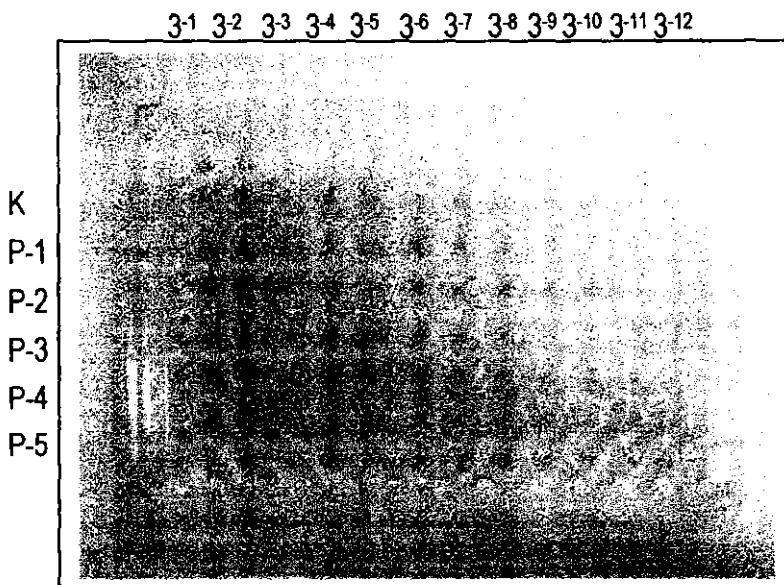
Titer antibodi ditentukan dengan teknik ELISA. Antibodi diencerkan dari  $3^{-1}$ ,  $3^{-2}$ ,  $3^{-3}$  dan seterusnya sampai  $3^{-10}$ . Pengujian titer antibodi dengan ELISA lebih sensitif dan spesifik karena teknik ELISA ini didasarkan pada reaksi antara antigen dan antibodi. Titer antibodi ditunjukkan dengan nilai OD. Pada penelitian ini dilakukan 4 pengukuran titer antibodi, yaitu titer antibodi sebelum imunisasi (pre-imun), setelah imunisasi I, II, dan III. Hasil penentuan titer antibodi dapat dilihat pada tabel 1, 2, 3, 4 dan 5.

Tabel 1. Titer antibodi sebelum imunisasi (pre-imunisasi)

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	0,438	0,416	0,606	0,460	0,444	0,412	0,388	0,378	0,438	0,428	0,399	0,324
P-2	0,698	0,653	0,623	0,577	0,542	0,525	0,543	0,433	0,410	0,377	0,361	0,332
P-3	0,543	0,522	0,431	0,428	0,417	0,387	0,365	0,211	0,207	0,115	0,106	0,098
P-4	0,856	0,902	0,368	0,707	0,819	0,800	0,691	0,697	0,568	0,530	0,553	0,342
P-5	0,443	0,423	0,415	0,398	0,376	0,358	0,342	0,321	0,319	0,312	0,296	0,275

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

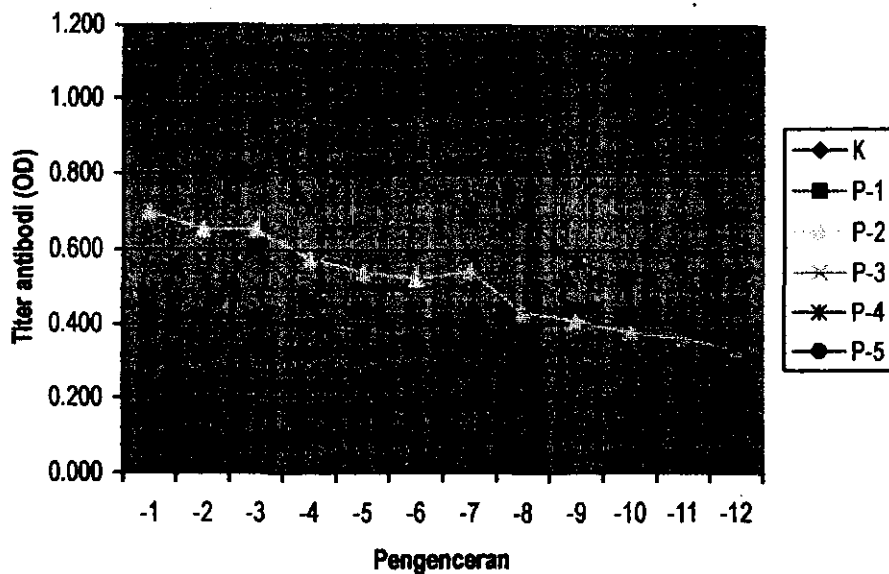
Titer antibodi pre-imunisasi didapatkan sebelum hewan coba diimunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 1, Gambar 1 dan 2).



Gambar 1. Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi yang diuji dengan metode ELISA

Nilai OD puncak yang didapatkan adalah 0,606; 0,698; 0,543; 0,968 dan 0,443.

Nilai OD pre-imun kurang dari 2 kali dari nilai OD kontrol negatif. Hal itu menunjukkan bahwa belum ada pembentukan antibodi terhadap protein membran spermatozoa.



Gambar 2. Titer antibodi kelinci jantan pre-imunisasi pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

Titer antibodi setelah imunisasi pertama didapatkan setelah hewan coba dimunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 2, Gambar 3 dan 4).

Tabel 2. Titer antibodi setelah imunisasi pertama

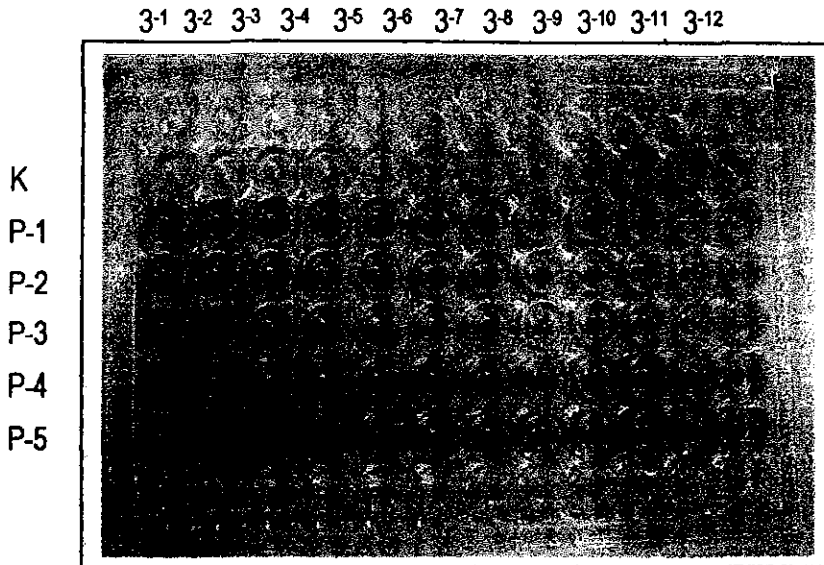
Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9	3-10	3-11	3-12
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,313	1,350	1,395	1,318	1,158	0,968	1,171	0,743	0,578	0,493	0,445	0,425
P-2	1,557	1,481	1,365	1,249	1,127	1,032	1,198	0,786	0,642	0,555	0,499	0,415
P-3	1,414	1,300	1,192	1,061	0,979	0,754	0,876	0,551	0,463	0,402	0,394	0,379
P-4	1,581	1,618	1,462	1,300	1,233	1,048	1,145	0,709	0,589	0,508	0,462	0,374
P-5	1,467	1,449	1,328	1,197	0,981	0,859	0,920	0,643	0,497	0,437	0,387	0,340

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

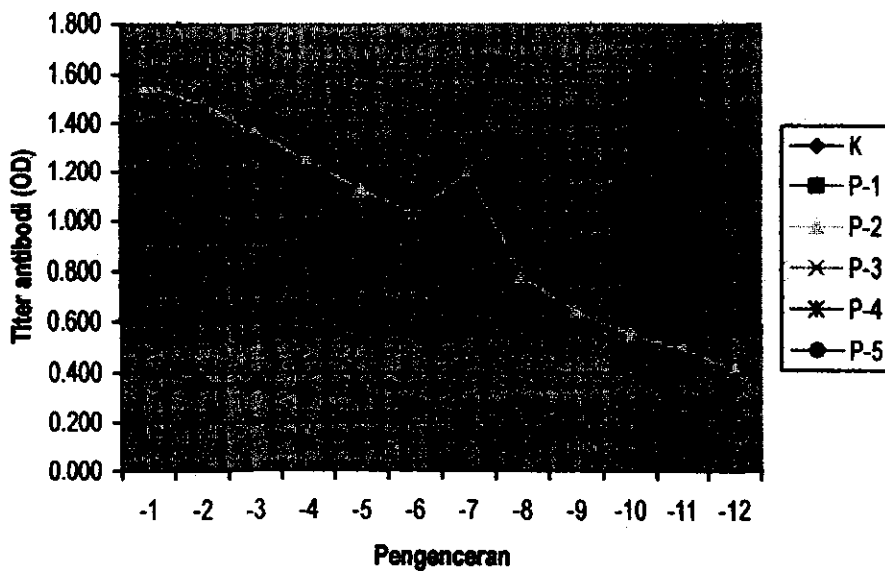
Nilai OD puncak yang didapatkan adalah 0,606; 0,698; 0,543; 0,968 dan 0,443.

Nilai OD pre-imun kurang dari 2-3 kali dari nilai OD kontrol negatif. Hal itu menunjukkan

bahwa belum ada pembentukan antibodi terhadap protein membran spermatozoa.



Gambar 3. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi I yang diuji dengan metode ELISA



Gambar 4. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi pertama pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan



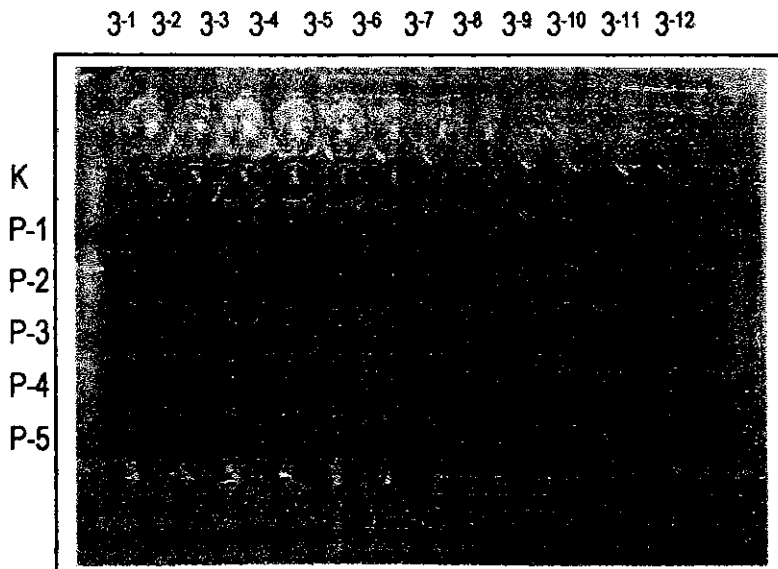
Titer antibodi setelah imunisasi kedua didapatkan setelah hewan coba dimunisasi dua kali dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 3, Gambar 5 dan 6). Nilai OD puncak adalah 1,690; 1,800; 1,785; 1,830; dan 1,781.

Bila dibandingkan dengan kontrol negatif didapatkan nilai OD lebih dari 4 kali. Hal ini menunjukkan bahwa imunisasi kedua dengan antigen yang sama telah lebih banyak lagi menstimulasi pembentukan antibodi. Interaksi antigen dan antibodi masih terbaca bagus pada pengenceran  $3^{-6}$  –  $3^{-8}$ .

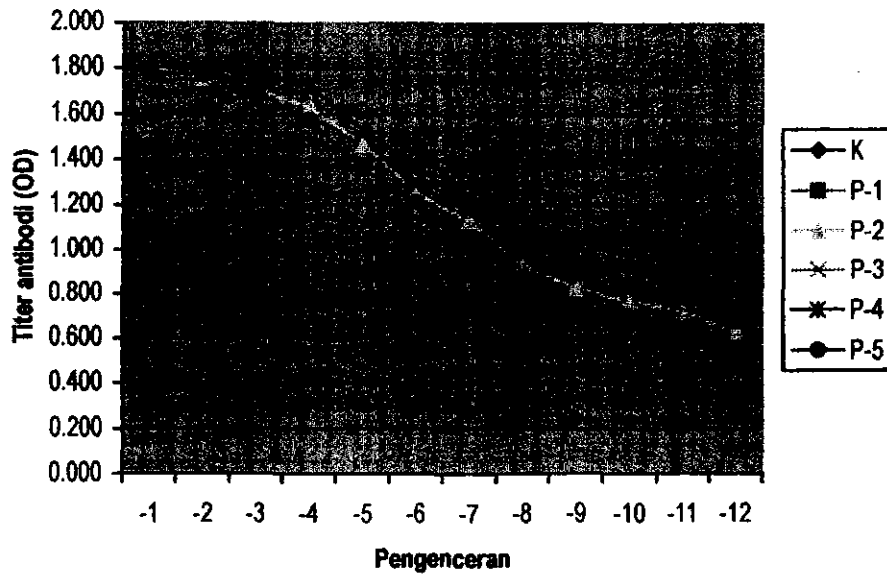
Tabel 3. Titer antibodi setelah imunisasi kedua

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-4</sup>	3 <sup>-5</sup>	3 <sup>-6</sup>	3 <sup>-7</sup>	3 <sup>-8</sup>	3 <sup>-9</sup>	3 <sup>-10</sup>	3 <sup>-11</sup>	3 <sup>-12</sup>
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,600	1,631	1,690	1,580	1,493	1,281	1,174	0,990	0,929	0,763	0,675	0,551
P-2	1,800	1,761	1,706	1,630	1,470	1,251	1,128	0,927	0,823	0,767	0,721	0,632
P-3	1,747	1,785	1,617	1,538	1,294	1,101	0,974	0,831	0,745	0,704	0,610	0,677
P-4	1,830	1,807	1,779	1,725	1,530	1,367	1,221	1,150	0,932	0,958	0,829	0,677
P-5	1,781	1,771	1,697	1,574	1,358	1,213	1,009	0,874	0,747	0,696	0,584	0,524

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan



Gambar 5. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi II yang diuji dengan metode ELISA



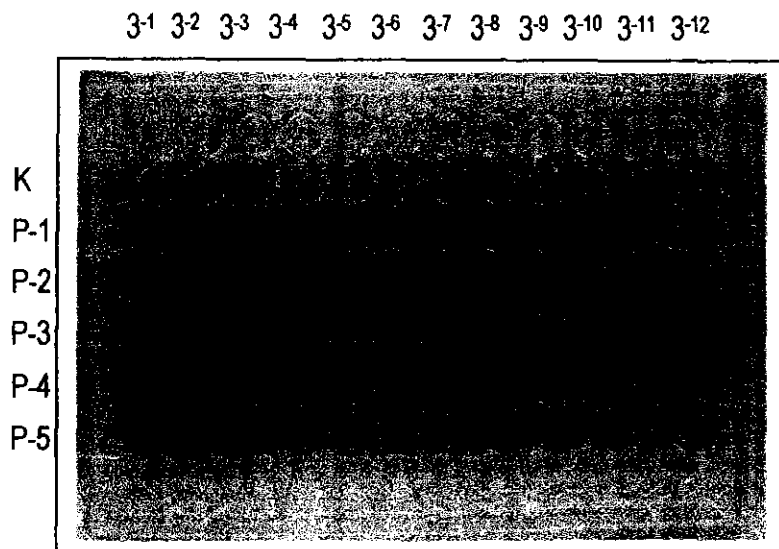
Gambar 6. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi kedua pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

Titer antibodi setelah imunisasi ketiga didapatkan setelah hewan coba dimunisasi tiga kali dengan antigen protein membran spermatozoa (Tabel 4, Gambar 7 dan 8). Nilai OD puncak adalah 1,794; 1,811; 1,729; 2,110; dan 1,822. Bila dibandingkan dengan kontrol negatif (0,400) didapatkan nilai OD pada imunisasi ketiga lebih dari 4 kali. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi lagi pembentukan antibodi akibat imunisasi dengan antigen protein membran spermatozoa.

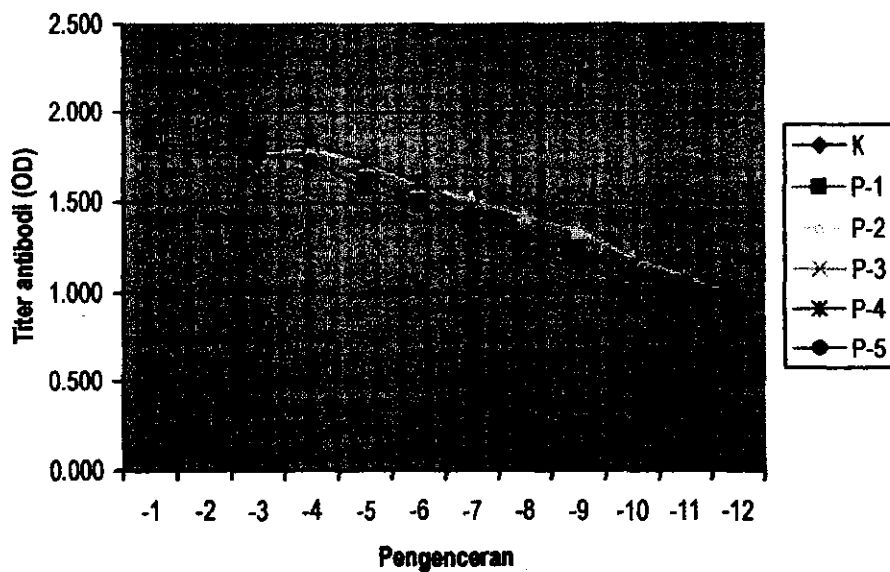
Tabel 4. Titer antibodi setelah imunisasi ketiga

Sampel	Nilai OD <sub>595nm</sub> pada pengenceran											
	3-1	3-2	3-3	3-4	3-5	3-6	3-7	3-8	3-9	3-10	3-11	3-12
K	0,400	0,358	0,357	0,314	0,309	0,282	0,273	0,283	0,245	0,232	0,208	0,247
P-1	1,779	1,779	1,794	1,757	1,654	1,532	1,422	1,251	1,203	1,004	0,998	0,885
P-2	1,811	1,809	1,769	1,792	1,718	1,596	1,522	1,431	1,352	1,195	1,097	0,980
P-3	1,729	1,628	1,582	1,610	1,511	1,455	1,313	1,232	1,260	1,106	1,042	1,004
P-4	1,937	2,110	1,854	1,836	1,729	1,611	1,473	1,282	1,183	1,148	0,992	0,914
P-5	1,822	1,813	1,765	1,725	1,583	1,486	1,365	1,306	1,244	1,111	1,061	0,981

Keterangan: K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan



Gambar 7. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi III yang diuji dengan metode ELISA



Gambar 8. Titer antibodi kelinci jantan setelah imunisasi ketiga pada berbagai pengenceran. K = Kontrol negatif, P = Perlakuan dengan imunisasi protein membran spermatozoa 200 µg/ml, 1-5 = jumlah ulangan

Hasil analisis titer antibodi dengan uji Anava menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ( $p < 0,05$ ) sehingga analisis dilanjutkan dengan uji LSD. Jika titer antibodi antara pre-imunisasi, imunisasi I, II, dan III dibandingkan, didapatkan bahwa titer antibodi pre-imunisasi (0,652) berbeda nyata secara signifikan dengan imunisasi I

(1,490), II (1,777), dan III (1,853). Titer antibodi antara hasil imunisasi I berbeda nyata secara signifikan dengan hasil imunisasi II. Sedangkan, antara hasil imunisasi II dengan imunisasi III menunjukkan perbedaan tetapi tidak signifikan (Tabel 5).

Tabel 5. Rerata titer antibodi dan pengenceran pada saat per-imunisasi, setelah imunisasi pertama, kedua, ketiga

Waktu Imunisasi	Nilai OD puncak pada ulangan ke ..					Rata ± SD	Pengenceran pada ulangan ke ...				
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
Pre-imun	0,606	0,698	0,543	0,968	0,443	0,652 a ± 0,200	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi I	1,395	1,557	1,414	1,618	1,467	1,490 b ± 0,095	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi II	1,690	1,800	1,785	1,830	1,781	1,777 c ± 0,052	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>
Imunisasi III	1,794	1,811	1,729	2,110	1,822	1,853 c ± 0,148	3 <sup>-3</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-1</sup>	3 <sup>-2</sup>	3 <sup>-1</sup>

Keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan ada signifikansi pada  $\alpha=5\%$  diuji dengan Anava dan LSD

Menurut Austyn dan Wood (1994) dan Bellanti (1993), terdapat dua respon imun yang terjadi sebelum pembentukan antibodi. Respon imun tersebut adalah respon imun primer dan respon imun sekunder. Reaksi awal saat pemaparan pertama antigen protein membran spermatozoa menimbulkan respon imun berupa fagositosis antigen tersebut oleh sel fagosit polimorfonuklear atau makrofag. Jika pada proses fagositosis ini masih ada antigen yang belum difagosit, maka antigen tersebut akan merangsang respon imun spesifik untuk membentuk antibodi. Respon imun yang terbentuk merupakan respon imun primer. Respon imun primer ini terdiri dari periode induktif dimana selama waktu tersebut antigen dikenal sebagai benda asing dan diproses, dan isyarat (signal) dikirim pada sel-sel yang ditugaskan untuk membuat antibodi. Hal ini merangsang aktivasi sel T untuk mengidentifikasi antigen dan menimbulkan respon

humoral untuk pembentukan antibodi antiprotein membran spermatozoa oleh sel B (Austyn dan Wood, 1994; Bellanti, 1993).

Peningkatan titer antibodi setelah imunisasi I, II, dan III menunjukkan telah terjadi respon imun terhadap antigen protein membran spermatozoa. Imunisasi dengan antigen yang sama lebih meningkatkan titer antibodi. Hal itu didukung oleh Goldsby *et al.* (2000), Grudzinskas dan Yovich (1995), dan Herscowitz (1993), setelah timbulnya antibodi pertama dimulailah biosintesis aktif antibodi, sehingga terjadi peningkatan konsentrasi antibodi secara logaritmik, yang mencapai titer antibodi tertinggi setelah 8-12 hari. Menurut Austyn dan Wood (1994), Goldsby *et al.* (2000), dan Herscowitz (1993), pemaparan kedua terhadap imunogen yang sama akan menyebabkan penambahan respon imun mencolok berupa munculnya sel-sel imonokompeten dan antibodi yang dipercepat. Pada respon sekunder periode laten lebih pendek, angka sintesis antibodi lebih cepat, puncak titer antibodi bertahan lebih lama, daya gabung antibodi lebih tinggi, lebih banyak terdapat sel memori dan lebih banyak Ig G.

## KESIMPULAN

Kesimpulan dari hasil penelitian adalah waktu imunisasi berpengaruh pada titer antibodi terhadap spermatozoa pada kelinci jantan. Titer antibodi setelah imunisasi III menunjukkan titer antibodi paling tinggi.

## PUSTAKA

Alexander, N.J. dan Bialy, G. (1994) Contraceptive Vaccine Development. *Reproduction, Fertility, and Development*, 6(3): 273 – 280.

Anonimus (2006) Isu Gender, Klien dan Pemberi Pelayanan dalam KB-KR. Gema Pria. <http://pikas.bkkbn.go.id/gemapria/article-detail.php>.

Anonimus<sup>a</sup> (2007) The Transmembrane Receptor. [http://en.wikipedia.org/wiki/the\\_transmembrane\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/the_transmembrane_receptor).

Anonimus (2008) Serba Serbi Kontrasepsi. <http://www.medicastore.com/oc/serbaserbi.htm>.

Austyn, J.N. dan Wood, K.J. (1994) *Principle of Cellular and Molecular Immunology*. Oxford: Oxford University Press.

Bellanti, J.A. (1993) *Immunologi III*. Terjemahan A. S. Wahab. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Bohring, C., Krause, E., Habermann, B. dan Krause, W. (2001) Testis and Spermatogenesis. Isolation and Identification of Sperm Membrane Antigens Recognized by Antisperm Antibodies, and Their Possible Role in Immunological Infertility Disease. *Molecular Human Reproduction*, 7(2): 113 - 118.

Bohring, C. dan Krause, W. (2003) Immune Infertility: Towards a Better Understanding of Sperm (Auto)-Immunity. The Value of Proteomic Analysis. *Human Reproduction*, 18(5): 915 - 924.

Chitra, K.C, Sudjatha, R., Latchoumycandane, C., dan Marthur, P.P. (2001) Effect of Lindane on Antioxidant Enzymes in Epididymis and Epididymal Sperm of Adult Rats. *Asian Journal of Andrology*, 3: 205 -208.

Domagala, A. dan Kurpisz, M. (2004) Identification of Sperm Immunoreactive Antigens for Immunocontraceptive Purposes: A Review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2: 11-18.

Goldsby, R.A., Kindt, T.J., dan Osborne, B.A. (2000) *Kuby Immunology*, edisi 4. W.H. Freeman and Company, New York.

Grudzinskas, J.G. dan Yovich, J.L. (1995) *Gametes The Spermatozoon*. Cambridge University Press, Melbourne.

Hamamah, S., Royere, D., Jean, M., Lucas, H., Barthelemy, C., Bariere, P., dan Lansac, J. (1997) The Future of Male Contraception by Preventing Gamete Interaction. *Contraceptive, Fertility and Sex*, 25(2): 311-24.

Hercowitz, H.B. (1993) Immunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi. Dalam Bellanti, J. A. (Eds) *Immunologi III*. Terjemahan A. S. Wahab. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Naz, R.K. (1996) Application of Sperm Antigen in Immunocontraception. *Frontier in Bioscience* 1, e87-95, September 1, 1996. <http://www.bioscience.org/1996/v1/e/Nas1/htmls/2/htm>.

- Naz, R.K. dan Vanek, C.M. (1998) Spermatozoa-Specific Protein and Their Role in Contraceptive Development. *Bioscience* 1, e39-48, 30 April 1998. <http://www.bioscience.org/1998/v1/e/Nas1/htmls/2/htm>.
- Primakoff, P., Woolman-Gamer, L., Tung, K.S., dan Myles, D.G. (1997) Reversible Contraceptive Effect of PH-20 Immunization in Male Guinea Pigs. *Biology of Reproduction*, 56:1142-1146.
- Rajeev S.K. dan Reddy, K.V.R. (2004) Sperm Membrane Protein Profiles of Fertile and Infertile Men: Identification and Characterization of Fertility-Associated Sperm Antigen. *Human Reproduction*, 19(2): 234-242.
- Suri, A. (2005) Sperm-Based Contraceptive Vaccines: Current Status, Merits and Development. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7: 1-16.
- Wahyuningsih, SPA. (2005) Efek Ekstrak Testis terhadap Angka Kebuntingan. *Seminar Nasional Biologi II*, 23 Juli 2005. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C. dan Aitken, J. (2001) Analysis of Reactive Oxygen Species Generating System in Rat Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 65: 1102-1113.
- Yatim, W. (1994) *Reproduksi dan Embriologi untuk Mahasiswa Biologi dan Kedokteran*. Penerbit Tarsito, Bandung.

## C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

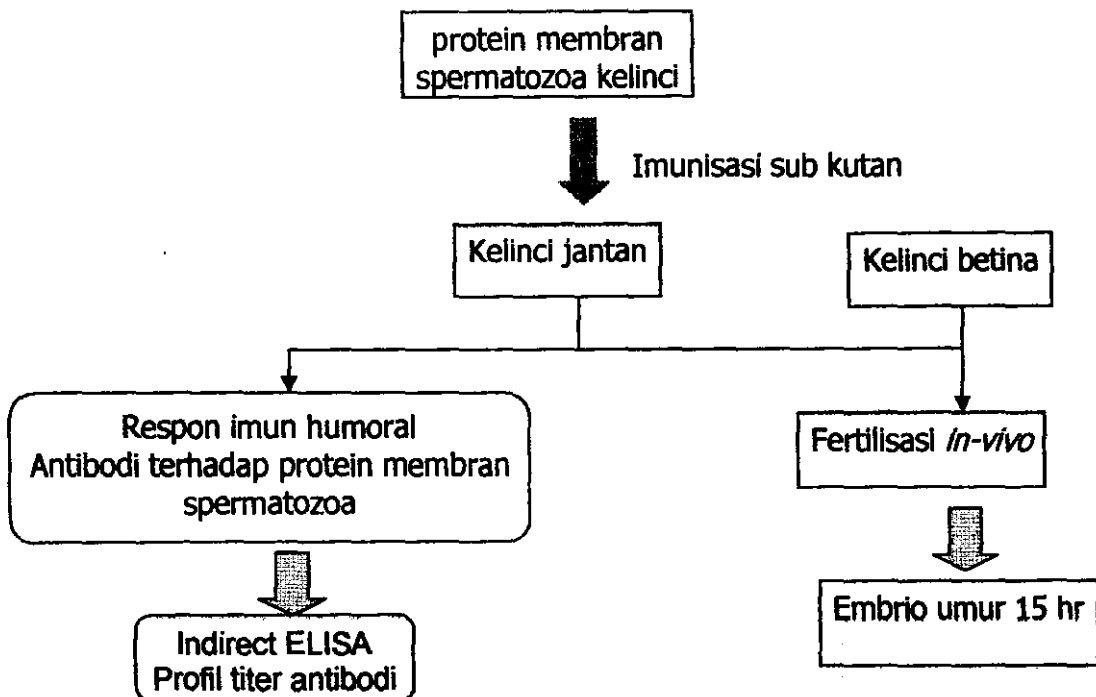
### C.1. Tujuan Khusus Penelitian Tahun Ketiga

Tujuan akhir penelitian tahun ketiga adalah mengetahui pengaruh protein membran spermatozoa kelinci sebagai antigen pada fertilisasi *in-vivo*. Tujuan khusus penelitian ini adalah :

1. Imunisasi kelinci dengan berbagai dosis protein membran spermatozoa.
2. Mengamati titer antibodi kelinci dari hasil imunisasi.
3. Mengawinkan kelinci hasil imunisasi dengan betina.
4. Mengamati kebuntingan dari kelinci betina.

### C.2. Metode Penelitian

Kerangka kerja penelitian pada tahun ketiga :





### C.2.1. Bahan Penelitian

1. Bahan untuk isolasi protein membran spermatozoa
2. Bahan untuk imunisasi pada kelinci dengan protein membran spermatozoa.
3. Bahan untuk ELISA
4. Bahan untuk fertilisasi in-vivo

### C.2.2. Alat Penelitian

Kandang kelinci, vortek, pipet mikro, tip (*blue type, yellow type dan white type*), tabung konikal 15 ml, gelas beker, tabung *Eppendorf*, jarum injeksi 1 dan 3 ml, kertas pH, timbangan analitik, gelas ukur, *refrigerated centrifuge*, ELISA reader, mikroskop, petridish, kulkas, dan perangkat alat bedah.

### C.2.3. Cara kerja tahap penelitian kedua

#### (a) Isolasi protein membran spermatozoa

Isolasi membran spermatozoa kelinci mengacu pada metode Bohring *et al.* (2001), Chitra *et al.* (2001), Rajeev dan Reddy (2004), serta Vernet *et al.* (2001), Koleksi pelet diresuspensi dalam keadaan hipo-osmotik dalam 10 mM PPB, pH 7,4, kemudian di homogenkan selama 5 menit dan disonikasi selama 8 x 15 menit. Suspensi tersebut selanjutnya disentrifus pada 1600 rpm selama 10 menit pada 4°C, supernatan dikoleksi (S<sub>1</sub>). Pelet diresuspensi lagi dalam 10 mM PPB, selanjutnya medium tersebut disentrifus lagi pada 1600 rpm selama 10 menit pada 4°C, supernatan dikoleksi (S<sub>2</sub>). Langkah seperti ini diulangi hingga mendapatkan supernatan yang cukup untuk mengisi tabung ultrasentrifus. Supernatan S<sub>1</sub> dicampur dengan supernatan S<sub>2</sub> dan 0,2 M NaCl dan 2 mM MgSO<sub>4</sub>. Selanjutnya campuran tersebut disentrifus pada

1600 rpm selama 30 menit pada 4°C untuk memisahkan mitokondria dari fraksi membran plasma. Supernatan yang mengandung membran plasma diultrasentrifus lagi pada 40.000 rpm selama 90 menit pada 4°C kemudian pelet yang mengandung membran plasma diekstraksi dengan 1% OSGP (w:v), 10% gliserol (v:v), 20 mM Tris, pH 8,6, mengandung inhibitor protease, dihomogenkan dengan vortex selama 30 menit pada 4°C. Fraksi larutan protein membran spermatozoa dikumpulkan.

#### **(b) Imunisasi kelinci dengan antigen protein membran spermatozoa**

Imunisasi pertama dilakukan dengan cara antigen protein membran spermatozoa spesifik dengan konsentrasi 0, 50, 100, 200, 400 µg/ml diemulsikan dengan PBS 0,1 ml dan *Freund's complete adjuvant* (FCA) 0,1 ml (perbandingan 1:1). Campuran tersebut disuntikkan secara subkutan. Sebagai kontrol digunakan kelinci dengan strain, jenis kelamin dan umur yang sama, tetapi imunisasi tanpa antigen. Imunisasi kedua dilakukan setelah 21 hari berikutnya dengan campuran antigen dalam PBS dan *Freund's incomplete adjuvant* (FICA) perbandingan 1:1. Imunisasi ketiga setelah 21 hari berikutnya dengan cara dan bahan yang sama seperti pada imunisasi kedua.

#### **(c) Pengaruh imunisasi pada pembentukan ASA**

##### **a. Isolasi ASA**

Antibodi antisperm (ASA) diisolasi dari tikus putih hasil imunisasi. Koleksi ASA diambil dari serum. Selanjutnya, ASA direaksikan dengan spermatozoa

##### **b. ELISA**

Titer antibodi diukur dengan cara *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

Setiap sumuran dari ELISA *plate* diisi 100 µl larutan antigen protein spermatozoa

dengan konsentrasi 5  $\mu\text{g/ml}$  dalam *coating buffer* dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Cawan mikrotiter dikosongkan dan ditambahkan 200  $\mu\text{l}$  larutan *blocking* (BSA 1%). Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37°C selama 10 menit. Cawan mikrotiter dikosongkan dan setiap sumuran diisi 100  $\mu\text{l}$  serum kelinci yang telah dimunisasi atau serum kontrol. Serum diencerkan secara berseri, yaitu 3<sup>-1</sup>, 3<sup>-2</sup> dan seterusnya sampai 3<sup>-10</sup>. Cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam dan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran diisi dengan 100  $\mu\text{l}$  larutan konjugat IgG *goat anti rabbit peroxidase* dengan konsentrasi 1  $\mu\text{g/ml}$  dalam 50% gliserol dan BSA 1%. Kemudian, cawan mikrotiter diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Cawan dicuci 3 kali dengan bufer pencuci. Setiap sumuran ditambah substrat ABTS sebanyak 100  $\mu\text{l}$  (1 mg/ml dalam bufer substrat dan 0,3  $\mu\text{l}$  hidrogen peroksida). Cawan ditutup aluminium foil dan diinkubasi pada suhu kamar selama 5 menit. Jika sudah timbul warna, maka cawan diberi larutan penghenti (*stop solution*). Selanjutnya, titer antibodi dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

#### **(d) Fertilisasi in-vivo**

##### **a. Penyiapan hewan betina**

Kelinci betina yang digunakan adalah hewan betina yang sudah pernah mempunyai anak 1 kali dan telah dinyatakan fertil.

##### **b. Uji fertilitas in-vivo**

Kelinci jantan yang sudah positif memproduksi antibodi dikawinkan dengan betinanya sebanyak 4 hari berturut-turut. Setelah 15 hari, kelinci betina dibedah. Parameter yang diamati adalah jumlah embrio yang terbentuk.

### C.3. Jadwal Kerja

Jenis Kegiatan	Bulan ke.....							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Persiapan Penelitian (penyediaan bahan habis dan peralatan)	X	X						
Perlakuan			X	X	X			
Pengamatan						X		
Analisis Hasil							X	
Penulisan Laporan dan Seminar								X

