

SKRIPSI

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUPPENSIS ZONA PELUSIDA
(ZP3) KAMBING TERHADAP ANGKA KEBUNTINGAN
DAN JUMLAH JANIN MENCIT (*Mus musculus*)**



Oleh :

DIAN YUNIARTI
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2002**

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA
(ZP3) KAMBING TERHADAP ANGKA KEBUNTINGAN
DAN JUMLAH JANIN MENCIT (*Mus musculus*)**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

DIAN YUNIARTI

NIM 069612259

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



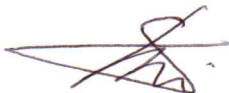
Budi Utomo, M.Si., Drh.
Pembimbing Pertama



Sri Mulyati, M. Kes., Drh.
Pembimbing Kedua

Setelah mempelajari dan menguji dengan sungguh-sungguh, kami berpendapat bahwa tulisan ini baik ruang lingkup maupun kualitasnya dapat diajukan sebagai skripsi untuk memperoleh gelar SARJANA KEDOKTERAN HEWAN.

Menyetujui
Panitia Penguji,



Suherni Susilowati, M.Kes., Drh.
Ketua



Abdul Samik M.Si., Drh.
Sekretaris



Imam Mustofa, M.Kes., Drh.
Anggota



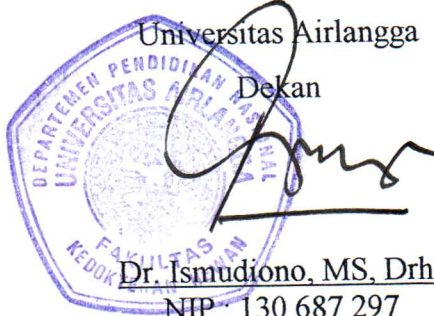
Budi Utomo, M.Si., Drh.
Anggota



Sri Mulyati, M.Kes., Drh.
Anggota

Surabaya, 3 April 2002
Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga
Dekan



Dr. Ismudiono, MS, Drh.
NIP : 130 687 297

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSİ ZONA PELUSIDA (ZP3)
KAMBİNG TERHADAP ANGKA KEBUNTINGAN
DAN JUMLAH JANIN MENCİT (*Mus musculus*)**

Dian Yuniarti

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah janin mencit (*Mus musculus*) pada satu periode kebuntingan.

Hewan coba yang digunakan adalah 40 ekor mencit betina (*Mus musculus*) dengan berat badan 20–30 gram. Disain percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terbagi menjadi empat perlakuan dengan sepuluh ulangan. Perlakuan yang diberikan adalah penyuntikan secara subkutan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing 0,05 ml dengan dosis pada perlakuan I, II dan III berturut-turut 10 µg, 20 µg dan 40 µg yang ditambah dengan Freund's Adjuvant 0,05 ml. Penyuntikan pertama menggunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) sedangkan booster pertama dan kedua menggunakan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Kontrol hanya diberikan suntikan 0,1 ml NaCl fisiologis. Booster diberikan pada hari ke-14 dan ke-21 setelah penyuntikan pertama.

Setelah masa perlakuan, mencit betina dikumpulkan dengan pejantan sampai terjadi kopulasi yang ditandai dengan adanya sumbat vagina. Pemeriksaan kebuntingan dan jumlah janin dilaksanakan pada hari ke-15 umur kebuntingan dengan pembedahan.

Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya penurunan angka kebuntingan pada perlakuan III dengan persentase angka kebuntingan sebesar 0% dan berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan I. Rataan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan juga mengalami penurunan sesuai dengan peningkatan dosis Zp3.

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan skripsi dengan judul Pengaruh Penyuntikan Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Janin Mencit (*Mus musculus*) dapat berjalan dengan lancar dan dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa keberhasilan penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan kali ini penulis menyampaikan rasa terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Bapak Budi Utomo, M. Si., Drh. selaku dosen pembimbing pertama serta Ibu Sri Mulyati, M. Kes., Drh selaku dosen pembimbing kedua, yang telah bersedia meluangkan waktu memberikan bimbingan serta nasehat yang sangat bermanfaat dalam penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Imam Mustofa, M. Kes., Drh. dan Ibu Suzanita Utama, M. Phil., Drh. yang telah memberikan saran dan kritik serta sarana yang sangat dibutuhkan oleh penulis.
3. Ayah, Ibu, mbak In, mas Piek, Andri serta mas Haris atas dorongan semangat dan restunya yang selalu menyertai penulis dalam menyelesaikan studi dan penyusunan skripsi ini.
4. Ibu Aulanni'am, DEA., Drh. dan Ibu Dra. Mahriani dari Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang atas sarana serta bantuan yang banyak diberikan kepada penulis.

5. Unik, Ismau, Bayu, Dite dan Yuli atas bantuan, dorongan dan pengertiannya.
6. Teman-teman yang tergabung dalam KMPV *Pet and Wild Animals* yang selalu mendorong penulis untuk menyelesaikan penyusunan skripsi.
7. Ninis, Andi '98, seluruh teman di Angkatan 96, mbak Surti, mbak Ida, serta semua pihak yang telah membantu yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Akhirnya penulis berharap semoga apa yang telah diberikan tersebut senantiasa menjadi amal kebaikan. Amien. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan didalam penulisan skripsi ini sehingga penulis sangat mengharapkan kritik dan saran. Harapan penulis semoga skripsi dapat bermanfaat bagi masyarakat.

Surabaya, Januari 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang Penelitian.....	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Landasan Teori.....	2
1.4. Tujuan Penelitian.....	3
1.5. Manfaat Hasil Penelitian.....	3
1.6. Hipotesis Penelitian.....	3
1.7. Definisi Operasional Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Zona Pelusida.....	5
2.2. Alat Reproduksi Betina.....	6
2.3. Siklus Reproduksi Mencit Betina.....	7
2.4. Fertilisasi dan Kebuntingan.....	8
2.5. Respon Imun.....	10
2.6. Antibodi.....	11

	2.7. Kontrasepsi.....	11
	2.7.1. Imunokontrasepsi.....	12
BAB III	MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	14
	3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
	3.2. Materi dan Bahan Penelitian.....	14
	3.2.1. Alat-alat Penelitian.....	14
	3.2.2. Bahan Penelitian.....	15
	3.2.3. Hewan Coba.....	16
	3.3. Metode Penelitian.....	16
	3.3.1. Preparasi Zona Pelusida.....	16
	3.3.2. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida.....	17
	3.3.3. Perlakuan Hewan Coba.....	17
	3.3.4. Pemeriksaan Kebuntingan dan Jumlah Janin.....	18
	3.3.5. Peubah yang Diamati.....	19
	3.3.6. Rancangan Percobaan dan Analisis Data.....	19
BAB IV	HASIL PENELITIAN.....	20
	4.1. Angka Kebuntingan Mencit.....	20
	4.2. Jumlah Janin yang Dikandung Mencit.....	21
BAB V	PEMBAHASAN.....	23
	5.1. Angka Kebuntingan Mencit.....	23
	5.2. Jumlah Janin yang Dikandung Mencit.....	26

BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN.....	28
	6.1. Kesimpulan.....	28
	6.2. Saran.....	28
	RINGKASAN.....	29
	DAFTAR PUSTAKA.....	31
	LAMPIRAN.....	34

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Angka Kebuntingan Mencit Setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing.....	20
2. Rataan Jumlah Janin yang Dikandung Mencit pada Satu Periode Kebuntingan Setelah Dilakukan Transformasi Data.....	21

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sel Telur Kambing.....	6
2. Peralatan Penelitian.....	15
3. Jumlah Janin dari Tiap Perlakuan.....	22

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Data Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Angka Kebuntingan Mencit.....	35
2. Analisis Uji Chi-Kuadrat dengan Faktor Koreksi Yates Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) kambing Terhadap Angka Kebuntingan Mencit.....	37
3. Analisis Data Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Jumlah Janin Mencit pada Satu Periode Kebuntingan	41
4. Analisis Data Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Jumlah Janin Mencit pada Satu Periode Kebuntingan.....	43
5. Elektroforesis SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>).....	44

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang Penelitian

Pesatnya laju pertumbuhan penduduk merupakan masalah serius yang dihadapi oleh bangsa Indonesia dan bangsa lain di dunia. Usaha pemerintah Indonesia dalam mengatasi masalah ini adalah dengan mencanangkan program Keluarga Berencana (KB). Masyarakat dapat memilih berbagai macam cara kontrasepsi yang telah ditawarkan, yaitu AKDR (Alat Kontrasepsi Dalam Rahim), pil, suntik dan susuk.

Salah satu metode alternatif kontrasepsi adalah dengan menggunakan metode imunokontrasepsi atau vaksin kontrasepsi. Dibandingkan dengan berbagai metode konvensional, metode ini relatif mudah, mempunyai efek samping rendah, harga yang lebih murah, bekerja secara spesifik, serta bersifat reversibel (Naz *et al.*, 1995) sehingga dimasa mendatang akan menjadi suplemen yang penting bagi program Keluarga Berencana. Bahan yang dipakai dalam metode imunokontrasepsi adalah bahan yang bersifat antigen, dan salah satunya dengan penggunaan zona pelusida sebagai antigen vaksin kontrasepsi (Epifano *et al.*, 1994; Castle dan Dean, 1996).

Penelitian yang telah dilakukan selama ini menggunakan bahan dasar zona pelusida babi atau *porcine zona pellucida* (pZp), yang mampu menghambat terjadinya ikatan dan penetrasi sel spermatozoa pada zona pelusida manusia (Mori *et al.*, 1985). Namun penggunaan zona pelusida babi sebagai bahan dasar untuk

imunisasi akan banyak menimbulkan masalah bagi masyarakat muslim, terutama di Indonesia yang mayoritas penduduknya beragama Islam.

Berdasarkan hal-hal tersebut diatas timbul pemikiran untuk mengadakan penelitian dengan menggunakan zona pelusida kambing sebagai alternatif bahan baku preparat imunokontrasepsi.

I.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang penelitian ini, permasalahan yang akan diteliti adalah sebagai berikut :

1. Apakah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan berpengaruh terhadap angka kebuntingan pada mencit.
2. Apakah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan berpengaruh terhadap jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan.

I.3. Landasan Teori

Reproduksi dimulai dari adanya penyatuan sel spermatozoa dan sel telur yang disebut juga sebagai fertilisasi. Sel spermatozoa dan sel telur keduanya memiliki sifat antigen pada permukaan selnya yang dapat terikat pada antibodi. Ikatan antara antibodi dan antigen tersebut dapat mengakibatkan kegagalan fertilisasi (Naz *et al.*, 1995).

Zona pelusida dengan molekul protein dan glikogen penyusunnya dapat bertindak sebagai imunogen yang merupakan bahan dasar dari pembuatan vaksin kontrasepsi pada wanita (Wood *et al.*, 1981). Menurut Gupta (1997) bahwa imunisasi pada wanita atau hewan betina dengan glikoprotein zona pelusida dapat memblok fertilisasi.

I.4. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan terhadap angka kebuntingan serta jumlah janin yang dikandung oleh mencit pada satu periode kebuntingan.

I.5. Manfaat Hasil Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah memberi informasi tentang adanya kemungkinan pemanfaatan zona pelusida kambing sebagai salah satu alternatif bahan baku preperat antifertilitas pada wanita maupun pada hewan betina.

I.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing dapat menyebabkan penurunan angka kebuntingan dan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan.

1.7. Definisi Operasional Penelitian

Suspensi adalah partikel-partikel padat yang terdispersi dalam suatu cairan. Zp3 adalah fraksi zona pelusida berdasarkan berat molekul dalam peneraan menggunakan SDS-PAGE. Berat molekul Zp3 kambing berdasar SDS-PAGE 73 kD. Kadar Zp3 per satuan zona pelusida dalam penelitian ini adalah 1,32 mikrogram. Suspensi Zp3 adalah Zp3 yang terkandung dalam zona pelusida dan terlarut atau terdispersi dalam NaCl fisiologis dan Freund's Adjuvant.

Freunds Adjuvant yang digunakan adalah *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) untuk vaksinasi pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk *booster* yang dilakukan dua kali dengan interval tujuh hari. Menurut Herbert (1974) CFA yang digunakan mengandung dinding sel *Mycobacterium* yang berfungsi untuk meningkatkan antibodi terhadap antigen spesifik, sedangkan IFA tanpa mengandung dinding sel *Mycobacterium*.

Angka kebuntingan adalah persentase hewan coba yang bunting setelah perlakuan dan diperiksa setelah lima belas hari usia kebuntingan. Jumlah janin adalah jumlah anak yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan yang dihitung setelah dilakukan pembedahan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

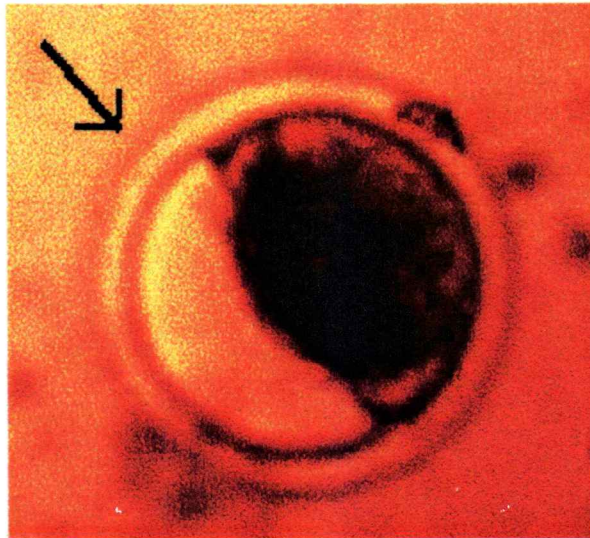
2.1. Zona Pelusida

Zona pelusida merupakan lapisan ekstra seluler yang mengelilingi sel telur (Gambar 1). Zona pelusida disintesis oleh sel telur pada saat oogenesis serta mempunyai fungsi penting selama fertilisasi dan masa awal periode embrionik (Yurewicz *et al.*, 1986).

Menurut Wodzicka (1991) zona pelusida bentuknya mirip gelatin yang kaya glikoprotein. Glikoprotein tersebut disekresikan oleh sel telur dan sel granulosa melalui vili-vili kecil yang masuk kedalam zona pelusida. Zona pelusida yang mengelilingi sel telur mamalia berfungsi sebagai media bagi pengenalan awal dan sebagai pengikat spermatozoa terhadap sel telur dan memainkan peranan penting pada proses fertilisasi.

Zona pelusida tersusun dari tiga glikoprotein yaitu Zp1, Zp2, Zp3. Peranan penting dari glikoprotein zona pelusida dalam proses reproduksi adalah sebagai antigen yang potensial untuk target imunokontrasepsi (Gupta *et al.*, 1997). Diantara komponen-komponen glikoprotein tersebut Zp3 yang berperan penting dalam fertilisasi. Fungsi Zp3 adalah sebagai reseptor pengenalan terhadap spermatozoa, sedangkan Zp2 sebagai reseptor spermatozoa yang kedua, untuk menjaga terikatnya spermatozoa selama proses menembus zona pelusida saat fertilisasi. Zp2 dan Zp3

membentuk kerangka yang dihubungkan oleh Zp1 menyilang membentuk struktur tiga dimensi (Neimann *and* Tribe, 1993; Tsubamoto *et al.*, 1999).



Gambar 1.

Sel telur kambing; bagian yang ditunjuk dengan anak panah adalah zona pelusida

2.2. Alat Reproduksi Betina

Secara umum alat reproduksi hewan betina dapat dibagi menjadi dua. Pertama adalah alat kelamin primer yaitu ovarium. Kedua adalah alat kelamin sekunder yang merupakan saluran reproduksi betina yang terdiri dari tuba Falopii, uterus, serviks, vagina dan vulva.

Ovarium sebagai alat reproduksi primer betina mempunyai dua fungsi utama yaitu fungsi eksokrin menghasilkan sel telur dan fungsi endokrin untuk menghasilkan hormon estrogen, progesteron, dan relaksin. Ketiga hormon tersebut sangat penting.

untuk membantu proses kebuntingan dan berperan pada proses kelahiran (Ismudiono, 1996).

Tuba Falopii atau sering disebut oviduk merupakan sepasang saluran kelamin betina yang menghubungkan ovarium dan uterus dalam hal ini adalah kornua uteri. Organ tersebut berfungsi untuk menerima sel telur yang diovulasikan ovarium, menampung semen yang dipancarkan oleh alat kelamin jantan, tempat fertilisasi dan menyalurkan embrio ke dalam uterus (Partodihardjo, 1992).

Uterus berfungsi untuk menerima sel telur yang telah dibuahi atau embrio dari tuba Falopii, dan pemberian makanan serta perlindungan bagi fetus. Uterus juga berfungsi mendorong fetus ke arah luar pada saat kelahiran. Uterus dibagi menjadi tiga bagian yaitu kornua, korpus dan serviks uteri (Hardjopranjoto, 1995).

Secara anatomis uterus mencit termasuk dalam tipe uterus dupleks, yaitu memiliki dua serviks, tanpa korpus uteri dan kornua uterinya terpisah secara sempurna (Nalbandov, 1990).

2.3. Siklus Reproduksi Mencit Betina

Mencit betina adalah binatang yang mempunyai siklus reproduksi poliestrus, artinya dalam satu tahun mengalami beberapa siklus estrus. Satu siklus berlangsung 4-5 hari. Siklus ini akan berulang secara periodik dengan jarak waktu tertentu, kecuali bila mencit tersebut bunting. Peristiwa ovulasi terjadi secara spontan pada waktu dekat akhir periode estrus.

Satu siklus birahi pada mencit dapat dibagi menjadi empat fase, yaitu fase proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Perubahan-perubahan fisiologi yang terjadi pada setiap fase tersebut dapat dilihat pada perubahan tingkah laku mencit betina maupun dengan cara melihat perubahan epitel vagina secara mikroskopik (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988). Pada pemeriksaan ulas vagina, saat fase proestrus sel-sel pada epitel vagina tampak normal, pada fase estrus ditandai dengan adanya sel-sel bertanduk, fase metestrus tampak adanya sel-sel bertanduk dan leukosit, sedangkan fase diestrus yang tampak hanya leukosit (Hafez, 1993).

Menurut Toelihere (1981), fase estrus merupakan fase terpenting dalam siklus birahi karena dalam fase ini hewan betina mau menerima pejantan untuk kopulasi. Hal ini disebabkan oleh pengaruh estrogen yang berasal dari ovarium sehingga terjadi pola tingkah laku yang khas pada berbagai hewan.

2.4. Fertilisasi dan Kebuntingan

Fertilisasi adalah proses penyatuan dua sel, yaitu sel jantan (spermatozoa) dan sel betina (ovum) sehingga terjadi sel-sel baru yang bersifat diploid. Tempat fertilisasi adalah pada bagian ampula tuba Falopii. Sel Spermatozoa untuk dapat mencapai inti sel telur harus menembus tiga lapisan yang menyelubungi inti sel telur yaitu sel-sel kumulus oophorus, zona pelusida dan membran vitelin (Hafez, 1993).

Spermatozoa mengalami serangkaian perubahan agar dapat membuahi sel telur. Pada membran plasma spermatozoa terjadi perubahan sensitivitas untuk

menstimulus terjadinya reaksi akrosom pada saat spermatozoa berada didekat sel telur, proses ini dikenal sebagai kapasitasasi. Pada saat reaksi akrosom terjadi peleburan membran plasma dengan membran akrosom terluar spermatozoa, serta terjadi aktivasi enzim-enzim yang terdapat dalam akrosom (Neimann *and* Tribe, 1993).

Sel-sel kumulus oophorus dapat dilewati oleh pergerakan spermatozoa dan dibantu oleh enzim hyaluronidase yang dilepaskan oleh spermatozoa untuk melarutkan asam hyaluronik pada kumulus oophorus. Hambatan selanjutnya adalah zona pelusida, penembusan kedalam zona pelusida disebabkan karena spermatozoa memiliki enzim zonalisin. Reaksi kimia antara spermatozoa dan zona pelusida menyebabkan terjadinya blokade untuk menghambat masuknya spermatozoa lain kedalam sel telur. Hal ini mungkin dihasilkan dari peleburan kortikal granula dari akrosom dengan zona pelusida. Reaksi ini yang disebut sebagai reaksi zona.

Selanjutnya sel spermatozoa akan bersentuhan dengan membran vitelin yang mengakibatkan timbulnya tonjolan kecil dari membran vitelin dan menyebabkan terjadinya blokade pada membran vitelin (blokade vitelin) untuk menghambat masuknya spermatozoa lain. Bersamaan dengan hal tersebut kepala sel spermatozoa akan menyusup ke dalam sitoplasma sel telur. Setelah menyatu dengan sel telur, maka terbentuklah sel baru yang bersifat diploid yang disebut embrio, sehingga dari saat ini hewan betina dinyatakan mulai bunting (Sorensen, 1979; Poernomo *et al.*, 2000).

Menurut Toelihere (1981) embrio membelah diri beberapa kali tanpa penambahan volume sitoplasma dalam prosesnya yang disebut *cleavage*. Proses ini berlangsung terus sampai terbentuknya blastosis. Pada jenis hewan beranak banyak, blastosis didistribusikan dan diimplantasikan sepanjang kornua uteri sebagai akibat pergerakan dinding uterus. Setelah blastosis berimplantasi, terjadi pertumbuhan dan perkembangan sehingga terjadi replikasi dari jenis hewan yang bersangkutan dan disebut dengan janin. Akhir masa kebuntingan ditandai dengan pengeluaran fetus dan plasenta dari induk.

Pada mencit kebuntingan dapat diketahui antara 10 sampai 14 hari setelah sumbat vagina ditemukan dengan meraba perut mencit. Sumbat vagina atau *vaginal plug* merupakan semen pejantan yang berkoagulasi di dalam vagina betina akibat aksi dari sekresi kelenjar prostat. Lama kebuntingan biasanya 19 sampai 21 hari (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988; Nalbandov, 1990).

2.5. Respon Imun

Respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan di luar dan di dalam tubuh (Baratawidjaja, 1998). Menurut Bellanti (1993) respon imun tubuh mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya.

Antigen merupakan suatu bahan yang dapat bereaksi dengan produk respon imun dan merupakan sasaran respon imun, sedangkan imunogen adalah suatu bahan atau molekul yang dapat menimbulkan respon imun. Suatu bahan atau zat yang bersifat imunogen selalu antigenik, tetapi antigen tidak selalu Imunogenik. Sifat imunogen ditentukan oleh sifat fisik dan kimia zat tersebut (Bellanti, 1993).

2.6. Antibodi

Pada dasarnya antibodi merupakan globulin gama yang disebut sebagai imunoglobulin dan biasa disingkat sebagai Ig. Secara umum imunoglobulin (Ig) dibagi dalam lima golongan, masing-masing diberi nama Ig M, Ig G, Ig A, Ig D dan Ig E. Imunoglobulin dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini akan mengikat antigen baru yang sejenis (Baratawidjaja, 1998). Menurut Bellanti (1993) antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap suatu antigen harus mempunyai ciri-ciri struktur yang berbeda dengan antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap antigen yang lain.

2.7. Kontrasepsi

Kontrasepsi berasal dari kata kontra dan konsepsi. Kontra berarti mencegah atau melawan, sedangkan konsepsi adalah pertemuan antara sel telur yang matang dan sel sperma yang menyebabkan terjadinya kehamilan. Sehingga kontrasepsi dapat

diartikan sebagai pencegahan terjadinya kehamilan sebagai akibat pertemuan antara sel telur dengan sel spermatozoa. Kontrasepsi dapat dipakai untuk menunda kehamilan, menjarangkan dan menghentikan kesuburan (Pabbadja, 1992). Pada manusia bisa dilakukan dengan cara *vasektomi* untuk pria dan pada wanita dengan pil, suntik, AKDR, susuk, *tubektomi* (Anonymous, 1988).

2.7.1. Imunokontrasepsi

Imunokontrasepsi merupakan kontrasepsi yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat imunogen yang bertujuan dapat mencegah konsepsi. Bahan antigen tersebut dapat berupa sperma, sel telur atau zona pelusida (Hamamah *et al.*, 1997).

Prinsip dasar vaksin kontrasepsi adalah menggunakan mekanisme pertahanan imun tubuh untuk menghasilkan perlindungan terhadap kehamilan atau kebuntingan yang tidak direncanakan (Jones, 1996). Naz *et al.* (1995) menyatakan infertilitas akibat penyuntikan antigen zona pelusida dan spermatozoa dapat menimbulkan antibodi untuk menghambat fungsi gamet.

Infertilitas akibat penyuntikan antigen bovine zona pelusida (Ag-bZp) pada hewan dapat mencapai 12 bulan terkait secara langsung dengan titer antibodi dalam darah (Hulme *et al.*, 1982). Pada dasarnya antigen zona pelusida dapat menimbulkan Ig G yang mampu memblokir pertautan spermatozoa dipermukaan zona pelusida

dengan cara menyelubungi reseptor spermatozoa pada permukaan zona pelusida (Aitken dikutip oleh Crighton, 1984).

BAB III

MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

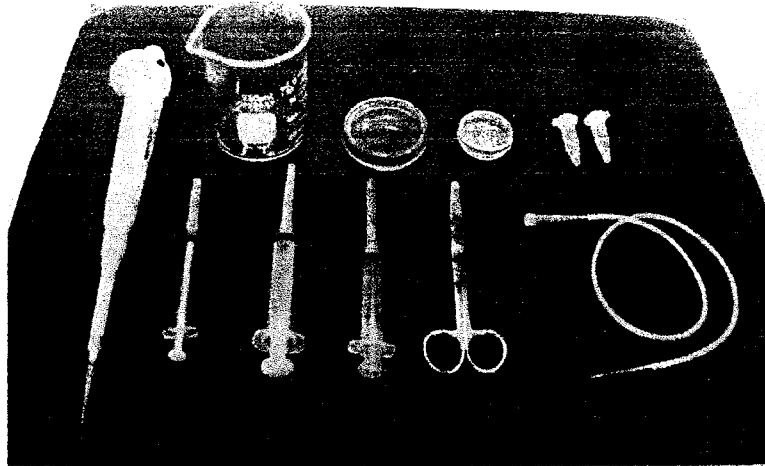
Pengumpulan sel telur dan preparasi zona pelusida dilakukan di Laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Identifikasi zona pelusida dan peneraan kadar Zp3 dalam zona pelusida dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang. Sonikasi dilakukan di Laboratorium *Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga Surabaya. Pemberian perlakuan di kandang hewan percobaan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga Surabaya. Penelitian dilaksanakan mulai tanggal 30 Agustus sampai dengan 31 Oktober 2001.

3.2. Materi dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat-alat Penelitian

Alat yang dipergunakan adalah kandang mencit berupa kotak plastik persegi empat dengan tutup anyaman kawat sebanyak delapan buah. Tempat minum dari botol, *disposable syringe* 5 ml dengan jarum 18 G untuk aspirasi sel telur dari ovarium, *disposable syringe* 1 ml untuk preparasi zona pelusida serta untuk penyuntikan mencit. Vial sebagai tempat zona pelusida, mikroskop *disecting*, alat *Ultrasonic Homogenizer* dengan probe berukuran 2 mm yang digunakan untuk proses

sonikasi, gelas Beaker, cawan petri, pipet, peralatan bedah, kapas steril, bak seksi untuk membedah mencit dan peralatan dokumentasi (Gambar 2).



Gambar 2.
Peralatan penelitian

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah zona pelusida (Zp3) yang terkandung dalam zona pelusida kambing yang disimpan dalam NaCl fisiologis, *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) yang berfungsi untuk mempertinggi dan mempertahankan titer antibodi, Chloroform untuk membunuh mencit. Makanan mencit berupa pakan ayam CP 511 produksi PT. Charoen Pokphand dan air mineral untuk minum mencit.

3.2.3. Hewan Coba

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya. Mencit yang dipilih adalah 40 ekor mencit betina yang sudah pernah beranak dan tidak dalam kondisi bunting serta mencit jantan yang sudah pernah membuntingi dengan berat badan 20-30 gram.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Preparasi Zona Pelusida

Ovarium kambing segar yang didapat dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya dicuci dan direndam dalam gelas Beaker yang berisi NaCl fisiologis. Folikel berukuran diameter 2-3 mm diaspirasi dengan menggunakan *disposable syringe* 5 ml dengan ukuran jarum 18 G. Sel telur hasil aspirasi tersebut diletakkan dalam cawan petri yang telah berisi NaCl fisiologis. Penghilangan sel-sel kumulus dilakukan dengan cara dipipet berulang-ulang. Selanjutnya dilakukan pembelahan zona pelusida dengan menggunakan *diposable syringe* 1 ml dibawah mikroskop *disecting*.

Tahap selanjutnya adalah penghilangan sitoplasma sel telur dengan cara dipipet berulang kali kemudian dilakukan pencucian dengan menggunakan NaCl fisiologis agar hasil yang didapat adalah zona pelusida murni. Kemudian dilakukan identifikasi untuk mendapatkan berat molekul Zp3 dengan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Setelah itu dilakukan

penghitungan zona pelusida sampai terkumpul 1800 buah. Jumlah tersebut diperoleh berdasarkan perhitungan dosis Zp3, jumlah hewan coba serta penyuntikan.

3.3.2. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida

Zona pelusida yang telah terkumpul tersebut ditempatkan ke dalam vial-vial untuk dihomogenkan dengan menggunakan *ultrasonic homogenizer* supaya zona pelusida tersebut hancur menjadi partikel-partikel yang lebih kecil. Selanjutnya dibagi kedalam beberapa vial dengan dosis yang berbeda. Masing-masing vial akan digunakan untuk satu kali perlakuan.

3.3.3. Perlakuan Hewan Coba

Sebelum dilaksanakan perlakuan, mencit betina ditempatkan dalam kandang selama 25 hari untuk mendapatkan keseragaman dan untuk pengamatan kondisi kesehatannya. Penentuan dosis suspensi zona pelusida (Zp3) berdasarkan metode yang dipakai oleh Wagner *and* Wolf (1977), untuk bahan atau obat yang belum diketahui dosisnya masing-masing dengan kelipatan dua atau tiga dari dosis sebelumnya.

Setelah masa adaptasi selesai, hewan coba diberi perlakuan dengan penyuntikan secara subkutan sebagai berikut : Kontrol (P0) hanya diberi suntikan NaCl fisiologis 0,1 ml. Sedangkan perlakuan I (P1), perlakuan II (P2) dan perlakuan III (P3) berturut-turut diberi suntikan suspensi Zp 0,05 ml yang mengandung 10 μ g.

20 μg , 40 μg Zp3 dalam adjuvant 0,05 ml. Sehingga tiap perlakuan hewan coba menerima suntikan sebanyak 0,1 ml.

Adjuvant yang ditambahkan dalam suspensi zona pelusida tersebut diatas adalah CFA pada penyuntikan pertama dan IFA pada penyuntikan kedua dan ketiga (*booster*). Perbandingan antara suspensi zona pelusida dan adjuvant adalah 1:1. Sebelum dilakukan injeksi, campuran tersebut dikocok dengan menggunakan pipet secara berulang-ulang sampai berwarna putih. *Booster* dilakukan pada hari ke 14 dan hari ke 21 setelah penyuntikan pertama. Menurut Bellanti (1993) titer antibodi tertinggi terhadap protein yang larut dicapai dalam 8-12 hari.

Setelah masa perlakuan selesai, mencit betina dikumpulkan dengan pejantan dengan perbandingan satu jantan dua betina sampai terjadi kopulasi. Setiap 24 jam dilakukan pengamatan terjadinya kopulasi dengan melihat adanya sumbat vagina.

3.3.4. Pemeriksaan Kebuntingan dan Jumlah Janin

Mencit betina yang diketahui sudah mengadakan kopulasi dengan ditemukannya sumbat vagina (ditetapkan sebagai hari ke nol umur kebuntingan) segera dipisahkan ke dalam kandang tersendiri.

Lima belas hari setelah hari pertama kebuntingan dilakukan pembedahan dengan tujuan untuk melakukan pengamatan angka kebuntingan dan jumlah janin yang dikandung mencit.

3.3.5. Peubah yang Diamati

Peubah-peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah persentase kebuntingan mencit pada masing-masing perlakuan dan jumlah janin yang dikandung mencit yang bunting pada satu periode kebuntingan.

3.3.6. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan empat perlakuan masing-masing dengan sepuluh ulangan.

Analisis data yang digunakan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida terhadap angka kebuntingan dilakukan dengan menggunakan uji Chi-kuadrat. Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka dapat diuji dengan faktor koreksi Yates untuk membandingkan antar sepasang perlakuan dan atau kontrol (Walpole, 1995). Data jumlah janin yang dikandung mencit dianalisis dengan uji beda rata-rata kelompok dengan menggunakan ANAVA (Analisis Varian). Apabila hasil analisis tersebut terdapat perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 5% (Kusriningrum, 1989).

BAB IV
HASIL PENELITIAN

4.1. Angka Kebuntingan Mencit

Data hasil pengamatan mengenai pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap angka kebuntingan mencit pada kontrol, perlakuan I, II dan III disajikan seperti pada tabel 1 dan analisis data selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 1.

Tabel 1. Angka kebuntingan mencit setelah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Bunting		Tidak Bunting	
		Jumlah	Persentase	Jumlah	Persentase
P0	10	10	100	0	0
PI	10	5	50	5	50
PII	10	2	20	8	80
PIII	10	0	0	10	100

Setelah dilakukan analisis statistik dengan menggunakan analisis Khi-Kuadrat diperoleh X^2 hitung sebesar 23,2225 sedangkan X^2 tabel (0,005)(3) sebesar 7,81473. Ini berarti X^2 hitung lebih besar daripada X^2 tabel sehingga dapat dinyatakan bahwa terdapat perbedaan yang nyata.

Analisis data dengan uji koreksi Yates terhadap angka kebuntingan setelah penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan menunjukkan bahwa PIII dengan dosis 40 μg Zp3 berbeda nyata dengan PI dosis 10 μg Zp3 tetapi

tidak berbeda nyata dengan PII dosis 20 μg . Kontrol menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap PI, PII dan PIII.

4.2. Jumlah Janin yang Dikandung Mencit

Data hasil pengamatan tentang pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan disajikan pada tabel 2 dan analisis data selengkapnya terdapat pada lampiran 3.

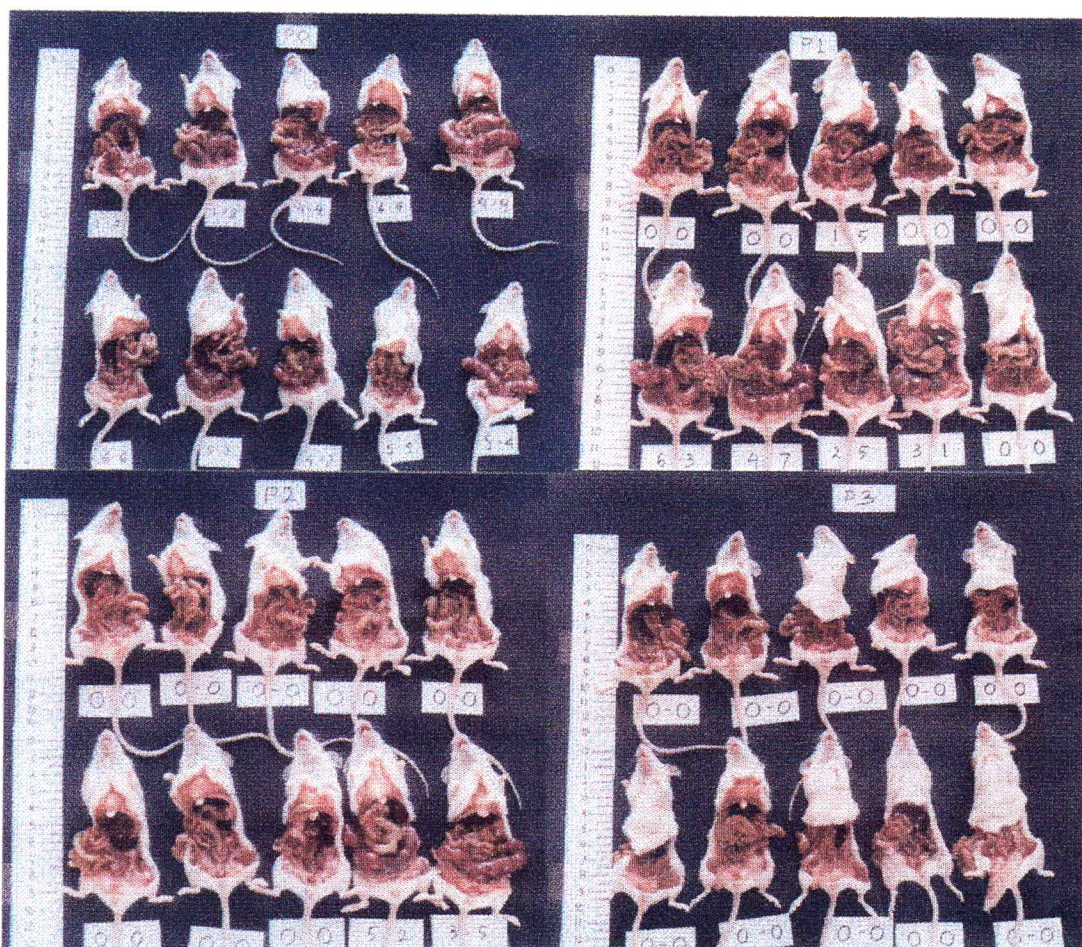
Tabel 2. Rataan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan setelah dilakukan transformasi data

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Jumlah Hewan Coba Bunting	Rataan Jumlah Janin ($\bar{x} \pm \text{SD}$)
P0	10	10	2,8133 ^a \pm 0,561
P1	10	5	1,7418 ^b \pm 1,138
P2	10	2	1,1310 ^{bc} \pm 0,895
P3	10	0	0,7070 ^c \pm 0

Setelah dilakukan transformasi dan uji beda rata-rata kelompok dengan ANAVA (Analisis Varian) diperoleh F hitung sebesar 13,875 sedangkan F tabel 0,05(3; 36) sebesar 2,872. Ini berarti F hitung lebih besar daripada F tabel, sehingga dinyatakan bahwa paling sedikit ada satu perlakuan yang berbeda.

Hasil analisis dengan uji BNT 5% menunjukkan rataan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan paling banyak terdapat pada kontrol atau P0 dan berbeda nyata dengan perlakuan I, II dan III (Gambar 3). Rataan Jumlah

janin yang paling sedikit terdapat pada PIII yang berbeda nyata dengan PI tetapi tidak berbeda nyata dengan PII.



Gambar 3.

Jumlah janin dari tiap perlakuan

BAB V

PEMBAHASAN

Penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan pada mencit betina (*Mus musculus*) bertujuan untuk mengetahui kemampuan dari zona pelusida sebagai bahan baku imunokontrasepsi karena zona pelusida mengandung protein yang dapat digunakan sebagai antigen yang mempunyai efek antifertilitas (Hamamah *et al.*, 1997). Pengujian efek antifertilitas zona pelusida dapat diketahui dengan pengamatan angka kebuntingan dan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan.

Perlakuan yang diberikan berturut-turut pada perlakuan I, II dan III adalah penyuntikan dengan 0,05 ml suspensi zona pelusida (Zp3) kambing yang mengandung 10 µg, 20 µg, dan 40 µg Zp3, ditambah dengan 0,05 ml Freund's adjuvant. Kontrol hanya disuntik dengan 0,1 ml NaCl fisiologis tanpa penambahan adjuvant untuk membandingkan pengaruh yang ditunjukkan pada masing-masing perlakuan. Penyuntikan pertama adjuvant yang ditambahkan adalah CFA, untuk booster pertama dan kedua ditambahkan IFA.

5.1. Angka Kebuntingan Mencit

Hasil pemeriksaan terhadap angka kebuntingan mencit menunjukkan adanya penurunan. Hasil pemeriksaan menunjukkan persentase angka kebuntingan pada

kontrol, Perlakuan I, II dan III berturut-turut adalah 100%, 50%, 20% dan 0%. Perlakuan I dengan dosis 10 μg Zp3 mengalami penurunan sebesar 50% bila dibandingkan dengan kontrol. Berturut-turut pada perlakuan II dan III dengan dosis 20 μg dan 40 μg Zp3 mengalami penurunan sebesar 80% dan 100% bila dibandingkan dengan kontrol.

Menurut Lee *and* Chi (1985) suatu bahan dapat berpengaruh positif sebagai antifertilitas apabila hasil dari perlakuan menunjukkan persentase angka kebuntingan kurang dari 60%. Hasil pemeriksaan pada perlakuan I, II dan III menunjukkan bahwa angka kebuntingan kurang dari 60%, namun hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan III dengan dosis 40 μg Zp3 dengan angka kebuntingan sebesar 0% atau tidak terjadi kebuntingan pada hewan coba. Analisis data dengan menggunakan uji Khi-Kuadrat, penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing pada PIII menunjukkan adanya perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan mencit. Hal ini berarti penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing berpengaruh terhadap angka kebuntingan pada mencit. Analisis data dengan uji koreksi Yates menunjukkan P0 (kontrol) berbeda nyata dengan PI, PII dan PIII. Hasil pengujian pada PIII menunjukkan bahwa angka kebuntingan pada PIII berbeda nyata dengan PI tetapi tidak berbeda nyata dengan PII.

Proses kebuntingan pada dasarnya berjalan secara normal bila tidak terdapat kelainan fungsi pada sistem reproduksi betina. Kelainan yang terjadi dapat dipengaruhi oleh banyak faktor antara lain gangguan ovulasi, kelainan fertilisasi,

hambatan implantasi dan sebagainya. Faktor-faktor tersebut yang dijadikan sebagai dasar daya kontrasepsi dengan mekanisme yang berbeda-beda.

Diduga turunnya angka kebuntingan akibat penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing disebabkan terbentuknya antibodi anti-zona didalam tubuh mencit yang memblok fertilisasi. Menurut Istianah (2000) zona pelusida kambing yang disuntikkan pada mencit betina akan merangsang terbentuknya respon imun dalam tubuh yang akan merangsang timbulnya antibodi spesifik dan non spesifik.

Respon imun spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dan dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Bila zona pelusida ini baru pertama kali masuk kedalam tubuh, maka sistem fagositik polimorfonuklear (PMN) dan sistem fagositik mononuklear akan mengikat, menelan, dan menghancurkan zona pelusida melalui suatu proses yang dikenal sebagai fagositosis. Potongan-potongan antigen tersebut ditampilkan pada permukaan makrofag agar dapat diidentifikasi oleh sel T. Kemudian sel T mengaktivasi sel B untuk menghasilkan imunoglobulin (Ig) (Baggish, 1996). Penyuntikan zona pelusida (Zp3) kambing diperkirakan akan menghasilkan imunoglobulin terutama Ig A dan Ig G (Jackson *et al.*, 1998). Dimana Ig A dan Ig G ada didalam alat reproduksi wanita dan hasil sekresinya (Hogarth, 1984).

Antibodi yang timbul menyerang zona pelusida yang terdapat pada sel telur yang diovulasikan sehingga menyebabkan terbentuknya imunopresipitat pada permukaan luar zona pelusida dan menutupi tempat pengikatan spermatozoa. Hal

tersebut mengakibatkan terjadinya kegagalan fertilisasi dan menyebabkan terjadinya kegagalan kebuntingan (Aitken dikutip oleh Crighton, 1984).

5.2. Jumlah Janin yang Dikandung Mencit

Dalam penelitian ini juga dilakukan perhitungan terhadap jumlah janin yang dikandung pada satu periode kebuntingan. Analisis data dengan uji BNT 5% menunjukkan bahwa rataan jumlah janin terkecil terdapat pada PIII yang berbeda nyata dengan PI namun tidak berbeda nyata dengan PII. Kontrol atau P0 mempunyai rataan jumlah janin terbanyak dan berbeda nyata dengan PI, PII dan PIII.

Menurut Lee *and* Chi (1985) suatu bahan dapat berpengaruh positif sebagai antifertilitas apabila hasil dari perlakuan yang diberikan menunjukkan persentase rataan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan bila dibandingkan dengan kontrol kurang dari 20%. Persentase rataan jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan pada perlakuan I, II dan III berturut-turut adalah 48%, 19,5% dan 0%. Berdasarkan hal tersebut pengaruh positif antifertilitas ditunjukkan pada PII dan PIII, tetapi hasil terbaik ditunjukkan pada PIII dengan dosis 40 μg Zp3.

Penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap mencit betina mempengaruhi penurunan rataan jumlah janin pada satu periode kebuntingan. Penurunan tersebut disebabkan karena kegagalan spermatozoa menembus zona pelusida sebagai akibat dari tertutupnya reseptor spermatozoa pada permukaan zona

pelusida oleh antibodi. Kegagalan fertilisasi ini menyebabkan terjadinya kegagalan kebuntingan. Adanya sejumlah janin pada PI dan PII mungkin disebabkan jumlah dosis yang diberikan kurang optimal dan antibodi anti-zona yang terbentuk dalam tubuh mencit rendah sehingga fertilisasi masih dapat terjadi dan mengakibatkan terjadinya kebuntingan. Pada PIII tidak terdapat janin karena dosis yang diberikan sudah optimal sehingga titer antibodi anti-zona yang terbentuk dalam tubuh mencit tinggi. Hal ini menyebabkan terjadinya kegagalan fertilisasi.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari serangkaian penelitian mengenai pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah janin mencit (*Mus musculus*), maka kesimpulan yang dapat diambil adalah :

1. Penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing dengan dosis 40 µg dapat menyebabkan penurunan angka kebuntingan pada mencit.
2. Penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing dengan dosis 40 µg dapat menyebabkan penurunan rata-rata jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang titer antibodi.
2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek samping akibat penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing.
3. Perlu dilakukan penelitian tentang dosis yang tepat untuk spesies yang berbeda.

RINGKASAN

Zona pelusida merupakan lapisan ekstraseluler yang mengelilingi sel telur dan tersusun dari tiga glikoprotein yaitu Zp1, Zp2 dan Zp3. Peranan penting glikoprotein zona pelusida dalam reproduksi adalah sebagai antigen yang potensial untuk imunokontrasepsi.

Imunokontrasepsi merupakan kontrasepsi yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan suatu bahan yang bersifat antigen. Pada dasarnya antigen zona pelusida dapat menimbulkan Ig G yang mampu memblokir pertautan spermatozoa dipermukaan zona pelusida dengan cara menyelubungi reseptor spermatozoa pada permukaan zona pelusida.

Telah dilakukan penelitian yang berlangsung mulai dari tanggal 30 Agustus sampai dengan 31 Oktober 2001 bertempat di kandang hewan percobaan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan zona pelusida (Zp3) kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah janin mencit.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan model percobaan Rancangan Acak lengkap (RAL). Hewan Percobaan yang dipergunakan 40 ekor mencit (*Mus musculus*) betina dibagi secara acak menjadi empat perlakuan dengan sepuluh ulangan. Perlakuan yang diberikan sebagai berikut: PI, PII dan PIII berturut-turut diberikan suntikan secara subkutan suspensi zona pelusida 0,05 ml yang mengandung

10 µg, 20 µg dan 40 µg Zp3 ditambah Freund's adjuvant 0,05 ml. P0 (kontrol) hanya diberi suntikan secara subkutan NaCl fisiologis 0,1 ml. Adjuvant yang ditambahkan dalam suspensi tersebut adalah *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada penyuntikan pertama sedangkan booster pertama dan kedua memakai *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA). Booster dilakukan pada hari ke-14 dan ke-21 setelah penyuntikan pertama. Mencit betina dikumpulkan dengan pejantan sampai terjadi kopulasi (ditandai dengan adanya sumbat vagina), kemudian mencit betina dipisahkan dari pejantan. Pada hari ke-15 umur kebuntingan dilakukan pembedahan untuk mengetahui angka kebuntingan dan jumlah janin yang dikandung mencit.

Hasil pemeriksaan dapat diketahui persentase kebuntingan pada kontrol, perlakuan I, II dan III berturut-turut 100%, 50%, 20% dan 0%. Hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan III dengan dosis 40 µg Zp3 menyebabkan tidak terjadinya kebuntingan pada seluruh hewan coba. Pemeriksaan jumlah janin menunjukkan terdapat penurunan rata-rata jumlah janin yang dikandung mencit pada satu periode kebuntingan sesuai dengan peningkatan dosis Zp3.

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, R. J., D. W. Richardson, M. Hulme. 1984. Immunological Interference with The Properties of Zona Pellucida. *in* : D. B. Crighton. Immunological Aspects in of Reproduction Mammals. British Library. England.
- Anonimous. 1988. Komunikasi Informasi dan Edukasi Medis Kontrasepsi. Edisi Kedua. BKKBN. Surabaya.
- Baggish, J. 1996. Bagaimana Sistem Kekebalan Tubuh Anda Bekerja. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta.
- Baratawidjaja, K. G. 1998. Imunologi Dasar. Edisi Ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.
- Bellanti, J. A. 1993. Imunologi III. Edisi Bahasa Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Castle, P. E. and J. Dean. 1996. Molecular Genetic of The Zona Pellucida: Implication for Immunocontraceptive Strategies. *J. Reprod. Fertil Suppl.*
- Epifano, O. and J. Dean. 1994. Biology and Structure of Zona Pellucida: a Target for Immunocontraception. *Reprod. Fertil Dev.* 6 (3): 319-30.
- Gupta, S. K., P. Jethanandani, A. Afzalpurkar, R. Kaul, R. Santhanam. 1997. Prospects of Zona Pellucida Glycoprotein as Immunogens for Contraseptive Vaccine. *Hum. Reprod. Update.* Jul-Aug; 3 (4): 311-24. New Delhi. India.
- Hafez, E. S. E. 1993. Reproduction in Farm Animals. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hamamah, S., D. Royere, M. Jean, H. Lucas, C. Barthelemy, P. Barriere, Lansac J. 1997. The Future of Male Contraception: Immunocontraception by Preventing Gamete Interaction. *Contracep. Fertil Sex.* Feb; 25 (2): 136-40.
- Hardjopranto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press.
- Herbert, W. J. 1974. Veterinary Immunology. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Hogart, P. J. 1984. Immunological Aspects of Reproduction-an Overview. University of York. UK.

- Hulme, M. J., R. J. Aitken and D. W. Richardson. 1982. Gamete Research. 5:27-281.
- Ismudiono. 1996. Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. Edisi I. Laboratorium Fisiologi Reproduksi Jurusan Reproduksi dan Kebidanan. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Istianah, F. 2000. Pengaruh Penyuntikan Suspensi Oosit Immatur Kambing Terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Janin Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jackson, R. J. D. J. Maguire, L. A. Hinds, I. A. Ramshaw. 1998. Infertility in Mice Induced by a Recombinant Ectromelia Virus Expressing Mouse Zona Pellucida Glycoprotein 3. *Biology of Reproduction* 58 : 152-159.
- Jones. 1996. Contraceptive Vaccines. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* Apr; 10 (1): 69-86. Australia.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kusriningrum. 1990. Perancangan Percobaan: Rancangan Acak Kelompok, Rancangan Bujursangkar Latin dan Percobaan Faktorial. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lee, E. B. and H. C. Chi. 1985. Female Antifertility Evaluation of Natural Products. In *Proceeding from The UNESCO Regional Workshop*. Seoul. November. PP : 18-22
- Mori, T., M. Kamada, S. Yamano, Kinoshita, K. Kano. 1985. Production of Monoclonal Antibodies to Porcine Zona Pellucida and Their Inhibition of Sperm Penetration Through Human Zona Pellucida in Vitro. *J. Reprod. Immunol.* Aug; 8 (1): 1-11.
- Nalbandov, A. V. 1990. Fisiologi Reproduksi Pada Mamalia dan Unggas. Edisi Ketiga. Penerbit Universitas Indonesia.
- Naz, R. K., A. Sacco, O. Singh, R. Pal, G. P. Talwar. 1995. Development of Contraceptive Vaccine for Human Using Antigens Derived from Gametes (Spermatozoa and Zona Pellucida) and Hormones (Human Chorionic Gonadotrophin): Current Status. *Hum. Reprod. Update.* Jan; 1 (1): 1-18.

- Neimann-Sorensen, A., D. E. Tribe. 1993. *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier Science Publisher B. V. Netherlands.
- Pabbadja, S. 1992. *Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera Untuk Kader*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Partodihardjo, S. 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan Ketiga. Penerbit Mutiara Sumber Hidup. Jakarta.
- Poernomo, B., M. Mafruchati, Widjiati, E. M. Luqman, E. D. Masithah. 2000. *Diklat Ilmu Mudigah. Laboratorium Fisiologi Reproduksi*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Smith, J. B. dan S. Mangkoewidjojo. 1988. *Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Sorensen, A. M. 1979. *Animal Reproduction, Principles and Practise*. McGraw-Hill Book Company. New York.
- Toelihere, M. R. 1981. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak*. Cetakan keempat. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Tsubamoto, H., N. Yamasaki, A. Hasegawa, K. Koyama. 1999. Expression of a Recombinant Porcine Zona Pellucida Glycoprotein Zp1 in Mammalian Cells Protein. *Expr. Purif. Oct; 17(1) : 8-15*
- Wagner, H. and Wolf. 1977. *New Natural Product and Plant Drug with Pharmacological Biological of Therapeutical Activity*. Spuinger Ver Lag. New York. PP : 1-36.
- Walpole, R. E. 1995. *Pengantar Statistika*. Edisi Ketiga. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wodzicka-Tomaszewska, M., I K. Utama, I G. Putu, T. D. Chaniago. 1991. *Reproduksi, Tingkah laku dan Produksi Ternak di Indonesia*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wood, D. M., C. Luu, and D. W. Richardson. 1981. *Biology of Reproduction*. 25:439-450.
- Yurewicz, E. C., A. G. Sacco, M. G. Subramanian. 1986. Pathways to Immunocontraception: Biochemical and Immunological Properties of Glycoprotein Antigens of The Porcine Zona Pellucida. *Adv. Exp. Med. Biol.* 207 : 407-27.

Lampiran 1. Analisis Data Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Angka Kebuntingan Mencit

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Bunting		Tidak Bunting	
		Jumlah	Persentase	Jumlah	Persentase
P0	10	10 (4,25)	100	0 (5,75)	0
PI	10	5 (4,25)	50	5 (5,75)	50
PII	10	2 (4,25)	20	8 (5,75)	80
PIII	10	0 (4,25)	0	10 (5,75)	100
Jumlah	40	17		23	

H_0 : Tidak ada perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan ($\pi_{ij} = \pi_{i+} \cdot \pi_{+j}$)

H_1 : Ada perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan ($\pi_{ij} \neq \pi_{i+} \cdot \pi_{+j}$)

$$\text{Statistik uji : } X^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

$$X^2 \text{ hitung} \sim \boxed{X^2_{db} (I-1)(J-1)} \longrightarrow (X^2 \text{ tabel})$$

Bila $X^2 \text{ hitung} > X^2 \text{ tabel}$ maka Tolak H_0
(Ada perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan)

$X^2 \text{ hitung} \leq X^2 \text{ tabel}$ maka Gagal Tolak H_0
(Tidak ada perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan)

$$\text{Nilai harapan terjadi kebuntingan} = \frac{10 + 5 + 2 + 0}{4} = 4,25$$

$$\text{Nilai harapan tidak terjadi kebuntingan} = \frac{0 + 5 + 8 + 10}{4} = 5,75$$

Rumus :

$$X^2 = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Penghitungan :

$$\begin{aligned} X^2 &= \frac{(10 - 4,25)^2}{4,25} + \frac{(5 - 4,25)^2}{4,25} + \frac{(2 - 4,25)^2}{4,25} + \frac{(0 - 4,25)^2}{4,25} + \frac{(0 - 5,75)^2}{5,75} + \frac{(5 - 5,75)^2}{5,75} + \\ &\quad \frac{(8 - 5,75)^2}{5,75} + \frac{(10 - 5,75)^2}{5,75} \\ &= 7,7794 + 0,1324 + 1,1912 + 4,25 + 5,75 + 0,0978 + 0,8804 + 3,1413 \\ &= 23,2225 \end{aligned}$$

$$\text{Derajat Bebas (db)} = (4 - 1) * (2 - 1) = 3$$

$$X^2 \text{ tabel } (0,05)(3) = 7,81473 \text{ dan } X^2 \text{ tabel } (0,01)(3) = 11,3449$$

Karena X^2 hitung $>$ X^2 tabel maka Tolak H_0

Artinya penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara sub kutan menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap angka kebuntingan mencit.

Lampiran 2. Analisis Uji Khi-Kuadrat dengan Faktor Koreksi Yates Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Angka Kebuntingan Mencit

$$\text{Rumus : } X^2 = \frac{n \{ |ad-bc| - \frac{1}{2} n \}^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Diketahui X^2 tabel $(0,05)(1) = 3,841$

Bila X^2 hitung $> X^2$ tabel maka tolak H_0
(Ada perbedaan yang nyata antar perlakuan)

X^2 hitung $< X^2$ tabel maka gagal tolak H_0
(Tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan)

1. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan P0 dengan P1

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
P0	10	0	10
P1	5	5	10
Jumlah	15	5	20

$$\begin{aligned} X^2 \text{ hitung} &= \frac{20 \{ |50-0| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 15 \times 5} \\ &= 4,267 \end{aligned}$$

Diketahui X^2 hitung adalah 4,267 dan X^2 tabel $(0,05)(1)$ sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata antara P0 dengan P1.

2. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan P0 dengan PII

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
P0	10	0	10
PII	2	8	10
Jumlah	12	8	20

$$X^2 \text{ hitung} = \frac{20 \{ |80-0| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 12 \times 8}$$

$$= 10,208$$

Diketahui X^2 hitung adalah 10,208 dan X^2 tabel (0,05)(1) sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata antara P0 dengan PII.

3. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan P0 dengan PIII

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
P0	10	0	10
PIII	0	10	10
Jumlah	10	10	20

$$X^2 \text{ hitung} = \frac{20 \{ |100-0| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 10 \times 10}$$

$$= 16,2$$

Diketahui X^2 hitung adalah 16,2 dan X^2 tabel (0,05)(1) sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata antara P0 dengan PIII.

4. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan PI dengan PII

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
PI	5	5	10
PII	2	8	10
Jumlah	7	13	20

$$X^2 = \frac{20\{ |40-10| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 7 \times 13}$$

$$= 0,879$$

Diketahui X^2 hitung adalah 0,879 sedangkan X^2 tabel (0,05)(1) sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara PI dengan PII.

5. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan PI dengan PIII

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
PI	5	5	10
PIII	0	10	10
Jumlah	5	15	20

$$X^2 = \frac{20\{ |50-0| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 15 \times 5}$$

$$= 4,267$$

Diketahui X^2 hitung adalah 4,267 sedangkan X^2 tabel (0,05)(1) sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang nyata antara PI dengan PIII.

6. Uji Koreksi Yates untuk membandingkan PII dengan PIII

Perlakuan	Bunting	Tidak Bunting	Jumlah
PII	2	8	10
PIII	0	10	10
Jumlah	2	18	20

$$X^2 = \frac{20 \{ |20-0| - \frac{1}{2} 20 \}^2}{10 \times 10 \times 2 \times 18}$$

$$= 0,556$$

Diketahui X^2 hitung adalah 0,556 sedangkan X^2 tabel (0,05)(1) sebesar 3,841. Hal ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata antara PII dengan PIII.

Lampiran 3. Analisis Data Pengaruh Penyuntikan Zona Pelusida (Zp3) Kambing Terhadap Jumlah Janin Mencit pada Satu Periode Kebuntingan

Ulangan	P0		P1		P2		P3	
	Jumlah Janin	Trans-formasi	Jumlah Janin	Trans-formasi	Jumlah Janin	Trans-formasi	Jumlah Janin	Trans-formasi
1	3	1,870	0	0,707	0	0,707	0	0,707
2	3	1,870	0	0,707	0	0,707	0	0,707
3	8	2,915	6	2,550	0	0,707	0	0,707
4	10	3,240	0	0,707	0	0,707	0	0,707
5	8	2,915	0	0,707	0	0,707	0	0,707
6	12	3,536	9	3,082	0	0,707	0	0,707
7	8	2,915	11	3,391	0	0,707	0	0,707
8	6	2,550	7	2,739	0	0,707	0	0,707
9	10	3,240	4	2,121	7	2,739	0	0,707
10	9	3,082	0	0,707	8	2,915	0	0,707
$y_{i.}$	77	28,133	37	17,418	15	11,310	0	7,070
SD		0,561		1,138		0,895		0
$\bar{y}_{i.}$		2,8133		1,7418		1,1310		0.707

Rumus Transformasi : $\sqrt{X+0,5}$ (Kusriningrum, 1990)

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, \dots, k; j = 1, \dots, n$$

μ = rata-rata

α_i = efek perlakuan ke-I

ε_{ij} = random error \sim NID (0, δ)

Bila F hitung $>$ F tabel maka tolak H_0
(Antar perlakuan sama ; $\delta_1 = \delta_2 = \delta_3 = \delta_4$)

F hitung $<$ F tabel maka gagal tolak H_1
(Paling sedikit ada satu perlakuan yang berbeda)

$$\begin{aligned} JKT &= \sum_i \sum_j y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{n} \\ &= 148,9806 - \frac{63,931^2}{40} \\ &= 148,9806 - 102,1793 = 46,8013 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKP &= \sum \frac{y_i^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{N} \\
 &= \frac{1272,7534}{10} - \frac{63,931^2}{40} \\
 &= 127,2753 - 102,1793 = 25,096
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JKS &= JKT - JKP \\
 &= 46,8013 - 25,0960 = 21,7053
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 KTP &= \frac{JKP}{k-1} \\
 &= \frac{25,0960}{3} = 8,3653
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 KTS &= \frac{JKS}{N-k} \\
 &= \frac{21,7053}{36} = 0,6029
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 F \text{ hitung} &= \frac{KTP}{KTS} \\
 &= \frac{8,3653}{0,6029} = 13,875
 \end{aligned}$$

Daftar ANAVA

Sumber Variansi	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F hitung	F tabel 0,05 (3;36)
Perlakuan	3	25,0960	8,3653	13,875	2,872
Sisa	36	21,7053	0,6029		
Total	39	46,8013			

Diketahui F hitung sebesar 13,875 dan F tabel 0,05(3;36) sebesar 2,872 maka :

Fhitung > Ftabel sehingga tolak H_0 yang berarti paling sedikit terdapat satu perlakuan yang berbeda.

Lampiran 5. Elektroforesis SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

Komposisi Gel SDS-PAGE

No	Bahan	Separating Gel	Stacking Gel
1	1,5 M Tris-HCl (pH 8,7) (ml)	1,75	1
2	2,9% Acrylamide + 0,8% Bis acrylamide (ml)	2,8	0,4
3	10% SDS (ml)	0,07	0,04
4	Air (ml)	2,38	2,3
5	Temed (μ l)	9	4
6	10% Ammonium Per Sulphate (APS) (μ l)	90	40

Sumber : Lab. Biokimia, FMIPA, Unibraw

Separating Gel dibuat dengan mencampur semua bahan kecuali APS dan Temed, kemudian didegas selama 10 menit. APS dan Temed ditambahkan, kocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* dan dibiarkan 10 - 30 menit sampai gel mengeras. *Stacking Gel* dibuat dengan cara yang sama tanpa didegas. Setelah *Separating Gel* mengeras, larutan *Stacking Gel* dituang di atasnya dan dipasang sisiran sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat *electrophoresis set mini protein gel*, dan *Running Buffer* dituangkan pada alat tersebut.

Zona pelusida dicampur dengan *Reducing Sample Buffer* dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya dimasukkan kedalam setiap sumuran masing-masing 20 μ l. *Running* dilakukan dengan arus konstan 40 mA sampai sampel berada 0,5 cm diatas dasar gel. Gel hasil *running* diwarnai dengan menggunakan *Comassie Brilliant Blue*.