

SKRIPSI

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA
KAMBING SECARA SUBKUTAN TERHADAP
BIOMETRI OVARIUM DAN UTERUS
MENCIT (*Mus musculus*) BETINA**



Oleh :

DITE MARTUSTHI KARTIKA LAKSMI
SURABAYA-JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2002

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA
KAMBING SECARA SUBKUTAN TERHADAP
BIOMETRI OVARIUM DAN UTERUS
MENCIT (*Mus musculus*) BETINA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan
Pada
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

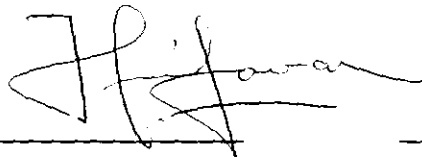
Oleh :

DITE MARTUSTHI KARTIKA LAKSMI

NIM. 069612272

Menyetujui,

Komisi Pembimbing



(Husni Anwar, Drh.)

Pembimbing Pertama



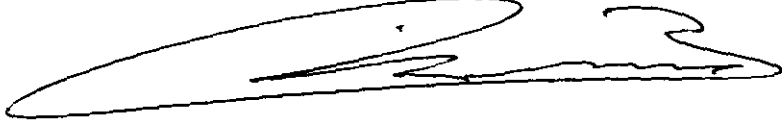
(Benyamin Chr. Tehupuring, M.Si., Drh.)

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,



(Dr. Bambang Sektiari L., DEA., Drh.)

Ketua



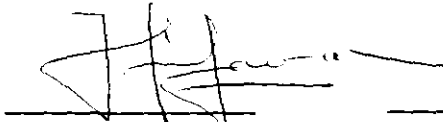
(Imam Mustofa, M.Kes., Drh.)

Sekretaris



(Tri Wahyu Suprayogi, M.Si., Drh.)

Anggota



(Husni Anwar, Drh.)

Anggota



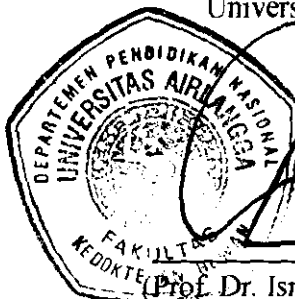
(Benyamin Chr. Tehupuring, M.Si., Drh.)

Anggota

Surabaya, 1 Mei 2002

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga



Dekan,

(Prof. Dr. Ismudiono MS., Drh.)

NIP. 130 687 297

*Tuntutlah Ilmu Kapanpun dan Dimanapun
Ilmu Berkembang Setiap Waktu*

*Pergunakan Ilmu Untuk Kebaikan
Jangan Gunakan Ilmu Untuk Kerusakan*

*Dalam Mengerjakan Segala Sesuatu
Dengarkan Kata Nuranimu
Jangan Hanya Gunakan Nafuri*

*“Kupersembahkan Karya Ini Untuk
Kedua Orangtuaku, Kedua Kakakku, Adikku
Serta Ilmu Pengetahuan”*

**PENGARUH PENYUNTIKAN SUSPENSI ZONA PELUSIDA
KAMBING SECARA SUBKUTAN TERHADAP
BIOMETRI OVARIUM DAN UTERUS
MENCIT (*Mus musculus*) BETINA**

DITE MARTUSTHI KARTIKA LAKSMI

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida kambing terhadap berat ovarium, berat uterus dan panjang uterus mencit (*Mus musculus*) betina.

Hewan coba yang digunakan terdiri dari 24 ekor mencit betina Balb-C berumur 2,5-3 bulan dengan berat 20-30 gram dan sudah pernah beranak. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan data yang dihasilkan diuji dengan uji F (Fisher). Penelitian ini terdiri dari tiga perlakuan yaitu kontrol (P0), perlakuan I (P1) dan perlakuan II (P2) dengan masing-masing delapan ulangan. Pada kontrol diberikan 0,1 ml NaCl fisiologis tanpa suspensi zona pelusida kambing. Perlakuan yang diberikan pada perlakuan I dan II berupa 0,05 ml suspensi zona pelusida kambing dengan dosis berturut-turut yaitu setara dengan 20 µg dan 40 µg Zp3 dalam 0,05 *Complete Freund's Adjuvant* untuk penyuntikan pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* untuk booster. Perlakuan tersebut disuntikkan pada hari ke-1, 14 dan 21 setelah masa adaptasi menggunakan *tuberculin syringe* 1 ml. Setelah diberi perlakuan, pada kontrol tidak dilakukan perkawinan sedangkan pada perlakuan I dan II dilakukan perkawinan dengan perbandingan jantan dan betina adalah 1 : 2. Pada hari ke-19 dari saat mencit betina dikumpulkan dengan mencit jantan, maka dilakukan laparatomi untuk mengambil ovarium dan uterusnya.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suspensi zona pelusida kambing tidak berpengaruh terhadap berat ovarium, berat uterus dan panjang uterus mencit (*Mus musculus*) betina.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, karena atas berkat dan rahmat-Nya skripsi yang berjudul “Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Secara SubKutan Terhadap Biometri Ovarium dan Uterus Mencit (*Mus musculus*) Betina” dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya. Skripsi ini merupakan salah satu persyaratan akademis untuk menyelesaikan studi strata I pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Kami menyadari bahwa apa yang telah kami lakukan dalam penyusunan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, kami sangat mengharapkan kritik dan saran yang dapat berguna bagi penyempurnaan skripsi ini di masa yang akan datang. Kami berharap semoga hasil yang telah dicapai dapat bermanfaat bagi pembaca dan ilmu pengetahuan.

Surabaya, Mei 2002

Penyusun

UCAPAN TERIMA KASIH

Dalam penulisan dan pembuatan Skripsi ini hingga selesai, penulis tidak lepas dari bantuan berbagai pihak yang senantiasa membantu sehingga penulis dapat menyelesaikan dengan sebaik-baiknya. Oleh karena itu dengan penuh kerendahan hati, rasa hormat dan dengan tulus ikhlas penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak dan Ibu tercinta, kakak-kakakku dan adikku serta semua saudaraku atas dorongan semangat, bantuan dan do'a restunya.
2. Bapak Prof., Dr. Ismudiono, MS., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
3. Bapak Husni Anwar, drh. selaku Dosen Pembimbing I dan Bapak Benyamin Chr. Tehupuring, M.Si., drh. selaku Dosen Pembimbing II yang telah bersedia memberikan saran, nasehat dan bimbingan dengan segala kesabaran.
4. Bapak Dr. Bambang Sektiari L., DEA., drh., Bapak Tri Wahyu Suprayogi, M.S., drh. yang telah bersedia menjadi Dosen Penguji. Bapak Imam Mustofa, M.Kes., drh. yang telah bersedia menjadi Dosen Penguji dan memberikan bimbingan serta dorongan moril.
5. Bapak Soeharsono, M.Si., drh. yang telah memberikan bimbingan serta dorongan moril. Ibu Aulia Ni'am, DEA., drh. dan Ibu Dra. Mahriani yang telah membantu dalam proses SDS-PAGE.

6. Mas Pomo, mbak Ida, mbak Surti, Unik, Ismau, Bayu, Yuli, Dian dan mas Haris, mbak Fitri, mbak Diah, mbak Zulfah, mbak Anis yang membantu menyelesaikan skripsi ini.
7. Sujud Mardi Raharja, Didik Tulus Subekti, Gigih Birista dan Wulan Andayani yang selalu membantu, memberi semangat dan doa.
8. Seluruh teman-teman angkatan '96 yang telah memberikan dukungan, bantuan, meramaikan suasana dan selalu kompak.
9. Rekan-rekan serta semua pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1. Rata-rata Panjang Uterus Mencit dalam milimeter (mm) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan	26
4.2. Rata-rata Berat Uterus Mencit dalam miligram (mg) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan	26
4.3. Rata-rata Berat Ovarium Mencit dalam miligram (mg) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Statistik dengan Uji F untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Panjang Uterus Dalam Satuan Centimeter (cm)	41
2. Analisis Statistik dengan Uji F untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Berat Uterus Dalam Satuan Gram (g)	43
3. Analisis Statistik dengan Uji F untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Berat Ovarium Dalam Satuan Gram (g)	44
A. Ovarium Kanan	44
B. Ovarium Kiri	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. Gambar alat reproduksi mencit betina	7
2.2. Gambar struktur sel telur	10

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
DAFTAR GAMBAR	X
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Landasan Teori	2
1.3. Perumusan Masalah	4
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat Hasil Penelitian	4
1.6. Hipotesis Penelitian	4
1.7. Definisi Operasional	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Alat Reproduksi Betina	6
2.1.1. Ovarium	7
2.1.2. Tuba Fallopii	12
2.1.3. Uterus	12
2.2. Antigen dan Imunogen	13

2.3. Antibodi	14
2.4. Respon Imun	14
2.5. Antifertilitas	15
2.6. Kontrasepsi	16
2.7. Imunokontrasepsi	16
2.8. Mencit (<i>Mus musculus</i>)	17
2.8.1. Siklus Birahi Mencit Betina	18
2.8.2. Cara Pemberian Obat Pada Mencit	20
BAB III MATERI DAN METODE	21
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian	21
3.2. Bahan dan Materi Penelitian	21
3.2.1. Hewan Percobaan	21
3.2.2. Bahan Penelitian	22
3.2.3. Alat-alat	22
3.3. Metode Penelitian	23
3.3.1. Persiapan	23
3.3.2. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida	23
3.3.3. Perlakuan Hewan Coba	24
3.3.4. Peubah yang diamati	25
3.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Data	25

BAB IV	HASIL PENELITIAN	26
BAB V	PEMBAHASAN	28
BAB VI	KESIMPULAN DAN SARAN	34
	RINGKASAN	35
	DAFTAR PUSTAKA	37
	LAMPIRAN	41

BAB I
PENDAHULUAN

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pelaksanaan program keluarga berencana (KB) di Indonesia memiliki tujuan menurunkan tingkat kelahiran dan meningkatkan kesejahteraan ibu dan anak dalam menuju keluarga bahagia dan sejahtera. Preparat kontrasepsi yang telah dipakai secara luas dewasa ini adalah metode kontrasepsi pil, suntikan depo derivat progesterone, alat kontrasepsi dalam rahim (AKDR), operasi (vasektomi, tubektomi) dan alat kontrasepsi fisik (diafragma, kondom, dan lain-lain).

Salah satu metode kontrasepsi yang dikembangkan saat ini adalah metode imunokontrasepsi atau vaksin kontrasepsi. Vaksin kontrasepsi mempunyai spesifitas tinggi, efek samping rendah, harga yang lebih murah dan pemakaiannya tidak sesering alat kontrasepsi yang ada saat ini (Naz *et al.*, 1995). Bahan ini menggunakan bahan yang bersifat antigenik (Ag), salah satunya adalah zona pelusida. Sifat reversibel dari antigen zona pelusida dalam membentuk antibodi merupakan faktor yang dapat menghilangkan efek samping, artinya tidak menimbulkan gangguan pada alat reproduksi (Raghupaty *and* Talwar, 1992). Zona pelusida sebagai vaksin kontrasepsi tidak ada kekhawatiran gangguan atau bahaya pada sistem di luar sistem reproduksi (Castle *and* Dean, 1996; Gupta *et al.*, 1997).

Penelitian yang telah dilakukan selama ini sebagian besar menggunakan bahan baku zona pelusida babi atau *porcine zona pellucida* (pZp), yang dapat

mengakibatkan hambatan atau meniadakan reaksi zona dengan spermatozoa pada manusia (Hasegawa *et al.*, 1991). Jika produk akhir penelitian ini dipasarkan dikhawatirkan akan menimbulkan masalah baru berupa masalah sosial khususnya bagi masyarakat muslim seperti di Indonesia. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian menggunakan zona pelusida non babi antara lain zona pelusida dari oosit kambing.

Selama ini, penggunaan metode hormonal sering menimbulkan keluhan kegemukan dan penimbunan lemak pada jaringan ovarium dan uterus, sehingga dalam penelitian ini dilakukan pengukuran biometri ovarium dan uterus sebagai langkah awal untuk mendeteksi akibat dari penyuntikan suspensi zona pelusida kambing atau *caprine zona pellucida* (cZp).

1.2. Landasan Teori

Zona pelusida adalah bahan ekstraseluler yang mengelilingi oosit dan mengandung glikoprotein berupa oligosakarida yang merupakan kunci dalam interaksi dengan spermatozoa (Talevi *et al.*, 1997), supaya terjadi fertilisasi dan preimplantasi (Gupta *et al.*, 1997). Umumnya zona pelusida yang terdiri dari glikoprotein yang mempunyai reseptor sperma dengan terminal unik galaktose dengan berat molekul sekitar 200 kilo Dalton (kDa) (Shimizu, 1982), sedangkan zona pelusida mamalia diketahui mengandung tiga macam glikoprotein, yaitu Zp1, Zp2 dan Zp3 dengan berat molekul masing-masing 137, 92 dan 62 kDa (Mc Cartney dan Mate, 1999). Protein yang mempunyai berat molekul lebih besar

dari 1000 Dalton adalah antigen (Tizard, 1988), sehingga zona pelusida mempunyai sifat sebagai antigen (Crightton, 1983).

Zona pelusida dengan molekul protein dan glikogen penyusunnya dapat bertindak sebagai imunogen yang merupakan kandidat bahan dasar dari pembuatan vaksin kontrasepsi pada wanita. Imunisasi menggunakan zona pelusida yang berasal dari ovum atau oosit matur dapat menyebabkan hambatan kesuburan serta tidak menimbulkan perubahan pada siklus hormon dan perkembangan pada folikel (Wood *et al.*, 1982).

Beberapa masalah yang perlu diteliti pada penggunaan imunokontraseptif adalah efek samping, cara pemberian dan *incomplete reversibility* (Epifano and Dean, 1994). Salah satu efek samping yang mungkin timbul adalah adanya perubahan biometri ovarium dan uterus. Hal tersebut tentu tidak diinginkan karena salah satu syarat kontrasepsi yang baik adalah tidak menyebabkan perubahan pada alat reproduksi.

Ovarium maupun uterus dalam melakukan fungsinya tidak lepas dari peranan beberapa faktor, baik berupa faktor yang dilakukan manusia atau faktor alam. Akibat berfungsinya ovarium dan uterus maka akan berpengaruh pula terhadap masing-masing ukuran yang ditimbulkan (Hardjopranto, 1982). Ukuran ovarium dan uterus tergantung pada umur dan status reproduksi. Pertumbuhan ovarium dan perkembangan histologisnya dikontrol oleh hormon-hormon yang berasal dari kelenjar pituitari (Nalbandov, 1990).

1.3. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas ingin diketahui apakah penyuntikan suspensi zona pelusida dari oosit kambing sebagai antifertilitas berpengaruh terhadap panjang uterus, berat uterus dan berat ovarium menciit.

1.4. Tujuan Penelitian

Penelitian ini untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida dari oosit kambing terhadap panjang uterus, berat uterus dan berat ovarium menciit.

1.5. Manfaat Hasil Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal mengenai penggunaan zona pelusida kambing sebagai bahan kontrasepsi pada hewan terhadap biometri ovarium dan uterus serta dapat sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk digunakan sebagai bahan kontrasepsi bagi manusia.

1.6. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang diajukan pada penelitian ini adalah penyuntikan suspensi zona pelusida tidak berpengaruh terhadap biometri ovarium dan uterus menciit.

1.7. Definisi Operasional

Suspensi adalah partikel-partikel padat yang terdispersi dalam suatu cairan. Zp3 adalah fraksi zona pelusida berdasarkan berat molekul dalam peneraan menggunakan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Berat molekul Zp3 kambing dalam penelitian ini adalah 73 kDa dan kadar Zp3 kambing per satuan zona pelusida adalah 1,32 mikrogram (μg). Suspensi Zp3 adalah Zp3 yang terdapat dalam zona pelusida yang terlarut atau terdispersi dalam NaCl fisiologis.

Freunds Adjuvant yang digunakan adalah *Complete Freunds Adjuvant* (CFA) untuk vaksinasi pertama dan *Incomplete Freunds Adjuvant* (IFA) untuk booster. Menurut Tizard (1988) CFA yang digunakan mengandung dinding sel mikobakteri yang berfungsi untuk meningkatkan antibodi terhadap antigen spesifik. Menurut Bellanti (1993) ajuvan bila disuntikkan bersama-sama antigen dapat memperbesar respon imun pada binatang terhadap antigen tersebut, penyimpanan antigen dalam tubuh menjadi lebih lama.

Biometri ovarium dan uterus terdiri dari pengukuran berat ovarium (gram), pengukuran panjang uterus (cm) dari serviks sampai kornua uteri dan pengukuran berat uterus (gram).

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

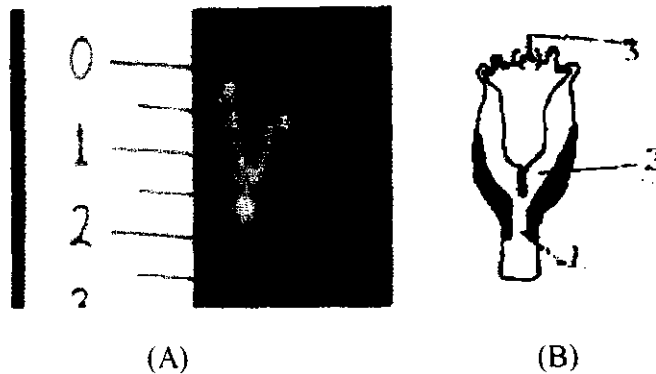
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alat Reproduksi Betina

Alat reproduksi betina tidak hanya berfungsi menghasilkan sel telur yang akan menjadi individu baru, tetapi juga bertanggung jawab menyediakan lingkungan yang serasi bagi individu baru tersebut dan memberi makan selama masa permulaan hidup dan pertumbuhannya. Fungsi tersebut dilaksanakan oleh alat reproduksi primer dan sekunder. Alat reproduksi primer betina berupa ovarium. Alat reproduksi sekunder berupa tuba Fallopii, uterus, serviks, vagina, vulva dan klitoris. Terdapat pula kelenjar susu sebagai alat reproduksi pelengkap karena sangat berkaitan dengan proses reproduksi yang penting untuk memberi makan individu yang akan dilahirkan (Toelihere, 1981).

Alat kelamin betina pada dasarnya dibagi menjadi dua bagian yaitu alat kelamin dalam dan alat kelamin luar. Alat kelamin dalam terdiri dari ovarium, tuba Fallopii, uterus, serviks dan vagina, sedang alat kelamin luar terdiri dari vulva, klitoris, *vestibulum tubae*, dan kelenjar *vestibulae*. Alat kelamin dalam, ke bagian dorsal digantung oleh beberapa alat penggantung. Ovarium digantung oleh mesovarium dan ligamentum lata utero ovarika. Tuba Fallopii digantung oleh mesosalpinx, sedangkan uterus, serviks dan sebagian vagina digantung oleh mesometrium atau sering disebut ligamentum lata (Hardjopranjoto, 1995)



Gambar 2.1. (A) Foto alat reproduksi mencit betina dengan ukuran skala dalam satuan cm dan (B) gambar skematis alat reproduksi mencit betina yang terdiri dari : (1) Serviks, (2) Uterus dengan tipe duplex dan (3) ovarium (Hardjopranto, 1995 dan Partodihardjo, 1992).

2.1.1. Ovarium

Ovarium terletak dekat rongga pelvis menggantung dari dinding perut sampai bagian belakang oleh mesovarium yaitu bagian depan dari ligamentum. Pada ligamentum penggantung ini lewat pembuluh darah arteri dan vena, limfe dan syaraf (simpatis dan para simpatis). Ovarium tertanam dalam bursa ovari (dibentuk dari ligamen penggantung) (Wodzicka *et al.*, 1991).

Ovarium merupakan alat reproduksi yang dapat menghasilkan sel telur dan hormon kelamin yaitu estrogen, progesteron dan relaxin. Ketiga hormon ini diperlukan untuk birahi, kebuntingan dan kelahiran (Hardopranto, 1995).

Ukuran ovarium tergantung pada status reproduksi (dewasa kelamin, bunting sudah pernah melahirkan). Berat ovarium normal pada mencit yang belum pernah melahirkan adalah 10 mg (Nalbandov, 1990). Ukuran ovarium betina yang pernah melahirkan lebih besar dua kali atau lebih daripada betina yang belum pernah melahirkan (Neimann, 1997).

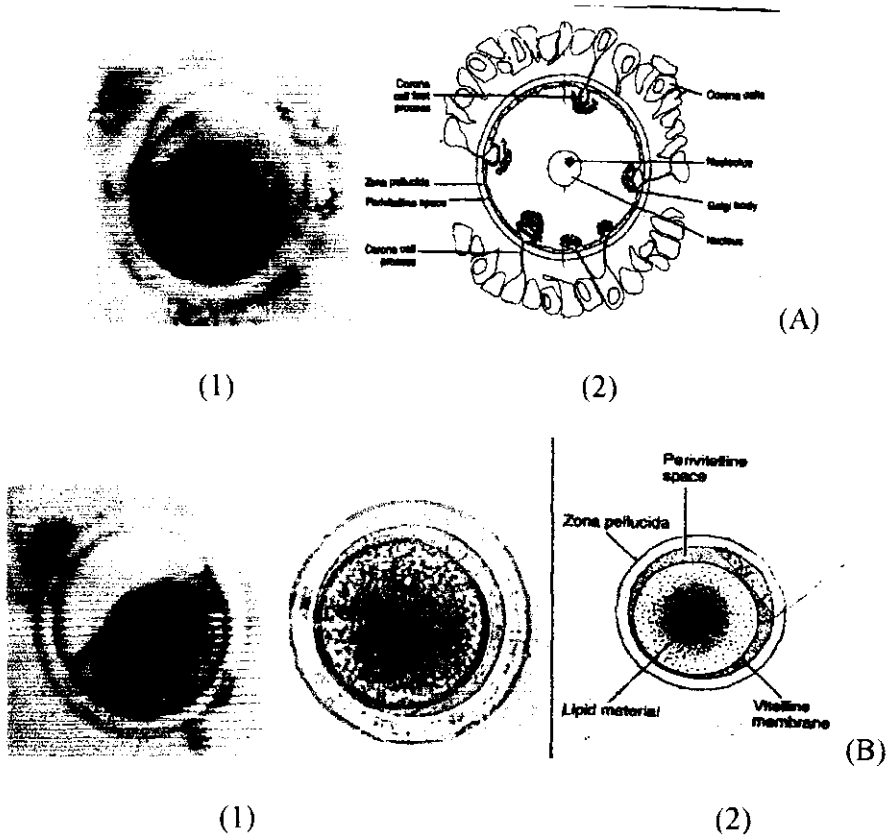
Pada perkembangannya oosit dikelilingi oleh selapis sel yang disebut folikel primer. Folikel primer terdapat di bawah tunika albugenia. Folikel primer kemudian berkembang menjadi beberapa lapis sel kemudian disebut folikel sekunder dan berkembang ke arah pusat stroma korteks. Pada stadium ini terbentuk zona pelusida yang bentuknya mirip gelatin yang kaya akan glikoprotein dan disekresikan oleh oosit dan sel granulosa yang keduanya memiliki vili-vili kecil yang masuk ke dalam zona pelusida (Hafez, 1993). Zona pelusida yang mengelilingi oosit mamalia berfungsi sebagai media bagi pengenalan awal dan sebagai pengikat spermatozoa terhadap oosit dan memainkan peranan penting pada proses fertilisasi (Wodzicka, 1991).

Pada tahap selanjutnya folikel sekunder menjadi folikel tersier yang ditandai dengan lebih banyaknya sel-sel granulosa, sehingga folikel tampak lebih besar dan letaknya lebih jauh ke permukaan. Folikel tersier ini akan mengalami proses pemasakan membentuk folikel de Graaf. Folikel de Graaf menunjukkan bahwa sel telur yang ada di dalamnya telah siap diovulasikan. Pada folikel de Graaf, ovum terbungkus oleh massa yang disebut dengan *cumulus oophorus* (Hafez, 1993). Beberapa lapisan sel yang membentuk folikel de Graaf dari dalam ke luar adalah sel-sel granulosa. Sel-sel ini melapisi dinding antrum, juga menjadi *cumulus oophorus*, massa sel yang membungkus dan terletak paling dekat dengan sel telur disebut *corona radiata*. Lapis kedua setelah sel-sel granulosa adalah lapisan teka folikuli yang terdiri dari teka eksterna yang fibrous dan teka interna yang vaskuler, selapis membran basal dan selapis tenunan pengikat. Estrogen disekresikan langsung oleh sel-sel teka interna ke dalam folikel melalui suatu

lapisan dasar, membrana propria, yang memisahkan teka interna dari membrana granulosa (Ismudiono, 1999). Pada banyak spesies ternak, badan polar pertama dibentuk pada saat folikel mencapai diameter maksimum serta oosit dan korona radiata mengapung bebas dalam antrum. Pada ternak domestikasi pembelahan meiosis kedua mulai setelah ovulasi, tetapi tidak sempurna kecuali pada pembuahan (fertilisasi) yaitu pembentukan badan polar kedua dan pronukleus betina (Wodzicka, 1991). Jumlah folikel yang berkembang selama siklus birahi tergantung pada faktor spesies hewan, fase reproduksi, keadaan lingkungan, umur, induk dan genetik (Hardjopranto, 1995). Jumlah dan derajat kematangan folikel dipengaruhi oleh hormon gonadotropin dari hipofisis (Ismudiono, 1999). Ovulasi berarti pecahnya folikel de Graaf dan dilepaskannya sel telur ke dalam tuba Fallopii (Wodzicka, 1991). Jika sel telur berhasil diovulasikan maka sisa folikel de Graaf akan berkembang menjadi korpus luteum. Pertambahan besar korpus luteum sangat cepat pada permulaan pertumbuhannya. Pada waktu bunting, korpus luteum dipertahankan tapi bila kebuntingan tidak terjadi, korpus luteum mengalami regresi. Segera setelah ovulasi, sel-sel granulosa dan theca yang sebelumnya membentuk korpus luteum berubah menjadi sel-sel lutea dan menghasilkan progesteron (Ismudiono, 1999).

Struktur sel telur yang telah diovulasikan dari folikel de Graaf terdiri dari sitoplasma yang berisi nucleus dan bahan kuning telur yang terbungkus selaput vitellin atau vitellus. Selaput vitellin dibungkus dengan sempurna oleh zona pelusida yang transparan. Di antara vitellin dan zona pelusida terdapat ruangan sempit yang berisi cairan yang disebut ruangan perivitellin (*perivitellin space*).

Segera setelah ovulasi ovum biasanya diselubungi oleh lapisan sel kumulus yang berbentuk mahkota yang disebut sebagai *corona radiata*. Pada beberapa spesies (rodensia, anjing, kucing) kumulus relatif tebal, tetapi pada sapi, kambing, domba, kuda, manusia kumulus relatif tipis. Susunan kimiawi ovum dari beberapa mamalia terdapat perbedaan salah satunya adalah adanya butiran-butiran lemak yang kecil dan terang banyak terdapat pada rodensia, anjing dan kuda sehingga sitoplasmanya berwarna gelap. Pada sapi, domba dan kambing terdapat juga butiran lemak tetapi tidak banyak (Ismudiono, 1999).



Gambar 2.2. (1) Foto sel telur dan (2) gambar skematis sel telur. (A) Sel telur yang dilapisi sel korona radiata sedangkan (B) merupakan sel telur tanpa sel korona radiata (Gordon, 1994).

Zona pelusida adalah suatu matriks ekstraseluler yang didapat dari oosit yang sedang tumbuh dan sel telur yang telah mengalami ovulasi (Greenhouse *et al.*, 1999). Menurut Keefe *et al* (1997) zona pelusida adalah lapisan glikoprotein yang membungkus oosit dan embryo, mengikat sperma setelah fertilisasi dan memudahkan transfer embryo sampai tuba Fallopii.

Zona pelusida mengandung tiga jenis glikoprotein yaitu Zp1, Zp2 dan Zp3. Peranan penting dari glikoprotein zona pelusida dalam proses reproduksi bersama dengan jaringan spesifik yang alami adalah sebagai kandidat yang spesial untuk imunokontrasepsi (Gupta *et al.*, 1997). Diantara komponen glikoprotein zona pelusida, Zp3 yang berperan penting dalam fertilisasi (Neimann, 1993) dan bertindak sebagai reseptor primer spermatozoa, dimana sebagian besar terdiri dari *O-linked oligosaccharida* (Xin Zhang *et al.*, 1997). Setelah Zp3 berikatan dan berinduksi dengan spermatozoa pada reaksi akrosom, maka ikatan sekunder pada protein zona pelusida yang lain adalah Zp2. Fungsi Zp2 adalah 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, 1993). Zona pelusida kambing mempunyai ketebalan 14 (11-16) μm (Ismudiono, 1999). Glikoprotein zona pelusida mengandung sejumlah antigenik yang menentukan antara lain karbohidrat, protein dan epitop yang sesuai. Imunogenisitas dari kompleks glikoprotein ini bervariasi pada mamalia (Skinner *et al.*, 1999).

2.1.2. Tuba Fallopii

Tuba Fallopii yang sering disebut oviduk merupakan saluran alat kelamin betina yang menghubungkan antara ovarium dan uterus. Organ tersebut berfungsi menerima sel telur yang diovulasikan oleh ovarium, menerima spermatozoa pada bagian ampulanya dan menyalurkan dan telur yang telah dibuahi di dalam uterus (Partodihardjo, 1992). Tuba Fallopii tergantung di dalam mesosalpinx dan dibagi menjadi tiga bagian yaitu infundibulum dengan fimbraenya, ampula dan isthmus. Di dalam tuba Fallopii terjadi kapasitasi sperma, fertilisasi dan pembelahan embryo yang pertama (Toelihere, 1981).

2.1.3. Uterus

Uterus adalah saluran reproduksi betina yang berbentuk buluh berurat daging yang berfungsi untuk menerima sel telur yang sudah dibuahi, memberi makan dan perlindungan janin selama kebuntingan dan pada stadium awal pengeluaran janin pada saat partus. Uterus ini dibagi menjadi tiga bagian yakni kornua, korpus dan serviks (Toelihere, 1981).

Uterus biasanya memiliki dua buah kornua dan sebuah korpus. Seluruh organ tersebut melekat pada dinding pinggul dan dinding perut dengan perantaraan ligamentum lata uteri. Melalui ligamentum inilah uterus menerima suplai darah dan syaraf. Lapisan luar ligamentum uterus yang menggantung disebut ligamentum teres uteri. Pada mencit tipe uterusnya adalah dupleks yang terdiri dari dua serviks dengan dua buah kornua yang terpisah secara sempurna tanpa korpus (Nalbandov, 1990), dimana kornua bermuara sebelum serviks (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Dinding uterus terdiri dari tiga lapisan yaitu selaput mukosa dan sub mukosa yang disebut endometrium, lapisan yang berada di tengah merupakan lapisan otot yang disebut sebagai miometrium dan lapisan luar yaitu lapisan serosa yang disebut sebagai perimetrium (Ismudiono, 1999).

Berat uterus normal pada mencit yang belum beranak adalah 22 mg (Nalbandov, 1990). Ukuran uterus betina yang pernah melahirkan lebih besar dua kali atau lebih daripada betina yang belum pernah melahirkan (Neimann, 1997).

2.2. Antigen dan Imunogen

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 humoral atau seluler. Pada umumnya imunogen adalah juga antigen meskipun tidak selalu demikian (Baratawidjaja, 1998).

Suatu bahan atau molekul untuk dapat bersifat imunogen, tergantung kepada beberapa faktor, yaitu : komposisi kimiawi, ukuran model, kompleks kimiawi, susunan genetik dari hewan itu sendiri, keasingan dan metode pelaksanaannya (Goodman, 1994).

Antigen pada umumnya adalah suatu protein, polisakarida besar, atau kompleks lipoprotein besar yang menyebabkan timbulnya kekebalan (Guyton, 1988). Sebagian besar imunogen adalah protein. Agar suatu zat dapat menjadi imunogenik, zat tersebut harus mempunyai ukuran minimal tertentu; imunogen yang efektif mempunyai berat molekul (BM) lebih besar 10 kDa (Bellanti, 1993).

Zona pelusida merupakan protein yang mempunyai sifat antigenik (Crichton, 1983) dan menurut Wood *et al.* (1982) zona pelusida mempunyai sifat imunogenik.

2.3. Antibodi

Pada dasarnya antibodi merupakan gama globulin yang disebut sebagai imunoglobulin atau biasa disingkat Ig, dan merupakan 20% dari seluruh plasma protein. Secara umum Ig digolongkan dalam lima golongan, masing-masing diberi nama Ig M, Ig G, Ig A, Ig D dan Ig E (Subowo, 1993). 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 lainnya yang sejenis (Baratawidjaja, 1988). Antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap suatu antigen harus mempunyai ciri-ciri struktur yang berbeda dengan antibodi yang dihasilkan pada respon terhadap antigen lain (Bellanti, 1993).

2.4. Respon Imun

Respon imun tubuh mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya, menetralkan, menyingkirkan atau memetabolisis benda asing tersebut dengan atau tanpa kerusakan pada jaringannya sendiri (Bellanti, 1993).

Respon imun dapat diartikan sebagai suatu sistem agar tubuh dapat mempertahankan keseimbangan antara lingkungan di dalam maupun di luar

tubuh. Tidak semua suntikan antigen menimbulkan respon imun. Respon imun tergantung dosis, waktu pemberian dan sifat antigen (Baratawidjaja, 1988).

2.5. Antifertilitas

Antifertilitas merupakan suatu bahan yang dapat mempengaruhi secara fisiologis sistem reproduksi hewan betina maupun jantan dengan tujuan untuk mencegah kebuntingan. Suatu bahan antifertilitas yang dapat menghambat terjadinya fertilisasi disebut kontrasepsi, sedangkan apabila bekerja sesudah implantasi disebut abortivum (Rahayu, 1988).

Bahan yang dapat digolongkan sebagai antifertilitas dapat bekerja pada berbagai tempat dalam tubuh yakni pada poros hipotalamus, hipofisa anterior, ovarium, tuba Fallopii, uterus, vagina dan proses spermatogenesis. Antifertilitas yang bekerja pada ovarium dapat mempengaruhi proses pembentukan dan perkembangan folikel serta gangguan proses ovulasi. Kerja antifertilitas pada tuba Fallopii dapat mempengaruhi transport sel telur maupun sel spermatozoa, proses fertilisasi dan transportasi zigot (Astika, 1998). Antifertilitas yang bekerja pada uterus mempengaruhi proses implantasi, organogenesis dan perkembangan janin (Lee and Chi, 1985). Antifertilitas dapat bekerja pada suatu tempat dan dapat bekerja pada lebih dari satu tempat di dalam tubuh dengan mekanisme yang berbeda (Rahayu, 1988).

Menurut East *et al* (1985) dikutip oleh Xin Zhang *et al* (1997) antibodi monoklonal terhadap Zp3 secara efektif dapat menghambat fertilisasi baik *in vitro* maupun *in vivo*.

2.6. 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 sel telur dengan sel sperma. Kontrasepsi dapat digunakan untuk menunda kehamilan, menjarangkan dan menghentikan kesuburan (Pabbadja, 1992). Untuk mencapai tujuan tersebut berbagai cara dapat dilakukan, antara lain penggunaan obat peroral, suntikan atau implantasi, subkutan, intra vaginal; penggunaan alat dalam saluran reproduksi (kondom, alat kontrasepsi dalam rahim/AKDR); operasi (vasektomi, tubektomi); atau dengan obat topikal intra vaginal yang bersifat spermisid (Suherman, 1995).

2.7. Imunokontrasepsi

Imunokontrasepsi merupakan kontrasepsi yang diberikan secara injeksi dengan menggunakan bahan yang bersifat antigen yang bertujuan untuk mencegah konsepsi (Hamamah *et al.*, 1997). Kandidat antigen spesifik yang telah diidentifikasi untuk imunokontrasepsi adalah antigen sperma, antigen zona pelusida dan antigen hormonal (Feng, 1999).

Prinsip dasar vaksin kontrasepsi adalah menggunakan mekanisme pertahanan imun tubuh untuk menghasilkan perlindungan terhadap kehamilan atau kebuntingan yang tidak direncanakan. Tujuan utama pengembangan vaksin kontrasepsi adalah untuk membuat imunisasi aktif terhadap sperma, ovum, zigot

dan embryo dini maupun *human Chorionic Gonadotropin* (hCG). Infertilitas akibat penyuntikan antigen yang berasal dari protein zona pelusida, spermatozoa, oosit dan embryo dini, terutama hCG dapat menimbulkan antibodi untuk menghambat fungsi gamet (Naz *et al.*, 1995).

Pada dasarnya antigen zona pelusida dapat menimbulkan Ig G yang mampu memblokir pertautan spermatozoa di permukaan zona pelusida dengan cara menyelubungi reseptor spermatozoa pada permukaan zona pelusida (Crightton, 1983). Imunokontrasepsi dengan menggunakan glikoprotein zona pelusida tidak menimbulkan perubahan pada siklus birahi hormonal dan perkembangan folikel pada ovarium (Gupta, 1997).

2.8. Mencit (*Mus musculus*)

Mencit mempunyai lama hidup antara satu sampai lima tahun dengan berat dewasa jantan 20-40 gram dan betina 18-35 gram. Dewasa kelamin mencit pada umur 35 hari dan dikawinkan pada umur delapan minggu. Siklus kelamin mencit adalah poliestrus, ovulasi secara spontan terjadi dekat akhir periode estrus. Estrus terjadi kira-kira tiap empat sampai lima hari, dan segera sesudah beranak. Biasanya estrus mulai antara jam empat sore dan jam sepuluh malam, dan biasanya betina kawin dalam tiga jam pertama periode estrus.

Ada dua macam sistem perkawinan yang biasa dipakai pada mencit, yaitu pertama adalah pasangan monogami yang terdiri dari seekor jantan dan seekor betina, kedua adalah pasangan poligami yang terdiri dari dua atau lebih betina dengan seekor pejantan. Kepastian waktu perkawinan mencit dapat diperiksa

adanya sumbat vagina. Sumbat ini merupakan air mani yang menjendal, dan dapat berasal dari sekresi kelenjar khusus mencit jantan. Sumbat ini tetap berada dalam vagina selama 16-48 jam, dan tidak mudah jatuh keluar. Lama bunting mencit biasanya 19-21 hari dan dapat dilakukan perabaan perut mencit pada hari ke 10-14 setelah sumbat vagina ditemukan. Jumlah anak mencit rata-rata enam, bisa mencapai 15 (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

2.8.1. Siklus Birahi Mencit Betina

Jarak antara birahi satu sampai birahi berikutnya disebut satu siklus birahi. Sedangkan birahi itu sendiri adalah saat dimana hewan betina bersedia untuk menerima pejantan untuk berkopulasi. Kopulasi itu dapat menghasilkan kebuntingan yang selanjutnya dapat menghasilkan anak (Partodihardjo, 1992).

Selama siklus birahi berlangsung perubahan yang terjadi pada sistem reproduksi yang dipengaruhi oleh hormon hipotalamus anterior yaitu *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), *Luteinizing Hormone* (LH) dan *Luteotropic Hormone* (LTH) serta hormon yang dihasilkan oleh ovarium yaitu estrogen dan progesterone. Hormon-hormon ini dikenal mempunyai fungsi khusus dalam pengendalian siklus birahi. Fungsi utama FSH adalah menstimulir pematangan folikel. FSH bekerjasama dengan LH menstimulir pematangan folikel dan pelepasan folikel. Sesudah pematangan folikel, LH menyebabkan ovulasi dengan menggerak pemecahan dinding folikel dan pemecahan ovum. LH juga berpengaruh terhadap pembentukan korpus luteum yang berasal dari folikel yang sudah pecah. Pada jenis tikus dan mencit aktivitas fungsional korpus luteum

dipelihara oleh hormon LTH atau disebut juga hormon prolaktin sehingga dapat dikatakan pula bahwa prolaktin menstimulir pelepasan progesteron (Toelihere, 1981).

Pada umumnya siklus birahi pada mencit dapat dibagi menjadi empat fase yaitu proestrus, estrus, metestrus dan diestrus. Perubahan-perubahan yang terjadi pada setiap fase dapat dilihat dari tingkah laku yang terjadi maupun dengan melihat perubahan vagina secara mikroskopis. Lama siklus birahi mencit antara empat sampai lima hari (Hafez, 1993).

Fase proestrus disebut juga fase persiapan. Fase ini biasanya ditandai dengan adanya perubahan pada tingkah laku dan alat kelamin luar. Perubahan tingkah laku secara umum pada mencit terlihat dengan mulai dapat menerima pejantan walaupun belum mau untuk melakukan kopulasi. Perubahan pada alat kelamin luar terlihat terjadi peningkatan peredaran darah di daerah vagina dan epitel vagina menebal, fase ini berlangsung 12 jam (Toelihere, 1981).

Fase estrus merupakan masa keinginan kawin, periode ini ditandai dengan manifestasi birahi secara fisik (Ismudiono, 1999). Fase ini berlangsung sekitar 12 jam, yang ditandai dengan penurunan aktivitas kelamin dalam arti mencit menjadi lebih tenang, daun telinga menunjukkan reaksi seperti gemetar, yang jelas mau menerima pejantan (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

Fase metestrus merupakan fase yang terjadi setelah fase estrus selesai. Pada mencit biasanya berlangsung selama 21 jam. Gejala luar tidak tampak nyata namun masih terdapat sisa-sisa estrus. Meskipun gejala estrus masih tampak tetapi hewan tidak mau menerima pejantan untuk menerima aktivitas kopulasi. Pada

ovarium terjadi pembentukan korpus hemoragikum pada tempat folikel de Graaf melepaskan ovum. Kelenjar-kelenjar endometrium mengubah sifat sekresinya dari cair menjadi kental, dimana lendir kental ini berfungsi sebagai sumbat servik sehingga servik tertutup (Partodihardjo, 1992).

Fase diestrus merupakan periode terakhir dan paling lama dalam siklus birahi yang ditandai dengan tidak adanya aktivitas kelamin serta hewan dalam keadaan tenang. Periode permulaan diestrus, korpus hemoragikum mengerut karena di bawah lapisan hemoragik ini timbul sel kuning sehingga dinamakan korpus luteum. Korpus luteum menjadi matang dan menghasilkan progesteron. Pada periode akhir ini korpus luteum akan mengalami degenerasi. Fase ini pada mencit berlangsung selama 56 jam (Partodihardjo, 1992).

2.8.2. Cara Pemberian Obat pada Mencit

Pemberian obat atau senyawa lain dapat dilakukan secara peroral, subkutan, intramuskuler, intravena, intraperitoneal. Cara yang paling mudah dilakukan pada mencit adalah secara sub kutan. Obat atau bahan kimia dapat diberikan kepada mencit dengan jarum yang panjangnya 0,5-1,0 cm dan ukuran 22-24 G (*gauge*). Obat bisa disuntikkan di bawah kulit di daerah punggung atau daerah perut (Smith dan Mangkoewidjojo, 1988).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Pengumpulan dan preparasi zona pelusida dari oosit kambing dilakukan di Laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Identifikasi kadar protein zona pelusida (ZP3) dilakukan di Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang. Proses sonikasi menggunakan alat *Ultrasonic Homogenizer* dilakukan di *Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga, Surabaya. Pemberian perlakuan di kandang hewan percobaan Laboratorium Fisiologi Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian ini dilakukan mulai 2 Maret sampai dengan 31 Oktober 2001.

3.2. Bahan dan Materi Penelitian

3.2.1. Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang dipergunakan adalah 24 ekor mencit (*Mus musculus*) Balb-C yang sudah dewasa kelamin dan sudah pernah beranak dengan berat badan 20-30 gram, diperoleh dari Pusat Veterineria Farma, Surabaya. Mencit jantan yang digunakan sebagai pejantan dipilih yang sudah pernah membuntingi.

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona pelusida dari oosit kambing yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya, disimpan dalam NaCl fisiologis sebagai media zona pelusida. *Complete Freund's Adjuvant* dan *Incomplete Freund's Adjuvant* untuk mempertahankan dan meningkatkan titer antibodi. Makanan mencit berupa pakan ayam CP 511 produksi PT. Charoen Pokphand dan air mineral untuk minuman mencit.

3.2.3. Alat-alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang mencit sebanyak sepuluh buah yang terbuat dari kotak plastik persegi empat dengan tutup dari kawat. Tempat air minum dari botol. *Disposable syringe* 5 ml dengan jarum 18 G untuk mengaspirasi oosit dari ovarium. *Tuberculine syringe* 1 ml untuk melepas zona pelusida dari oosit dan menyuntik mencit. Cawan petri sebagai tempat oosit yang akan dipecah. Vial sebagai tempat zona pelusida. *Microscope Dissecting* (Meiji, Japan) untuk melihat dan menghitung jumlah oosit dan jumlah zona pelusida. Mikropipet untuk menghilangkan sel kumulus dari oosit. Identifikasi kadar protein zona pelusida (ZP3) dengan *sodium dodecyl sulfat-polyacrilamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). Alat *Ultrasonic Homogenizer* dengan probe berukuran 2 mm yang digunakan untuk menghancurkan zona pelusida menjadi partikel yang lebih kecil. Skalpel, pinset, gunting bak seksi untuk membedah mencit. Timbangan mikro untuk mengukur berat ovarium dan uterus. Alat pengukur panjang. Alat dokumentasi.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Persiapan

Mencit sebagai hewan coba diadaptasikan selama 14 hari untuk menyesuaikan kondisi lingkungan. Pakan dan minum diberikan secukupnya, dan ruangan tempat pemeliharaan mencit dalam keadaan bersih. Sistem perkawinan yang digunakan adalah sistem poligami.

3.3.2. Pembuatan Suspensi Zona Pelusida

Ovarium segar dicuci lalu direndam dalam NaCl fisiologis selama perjalanan dari Rumah Potong Hewan ke Laboratorium. Folikel berukuran 2-3 mm diaspirasi menggunakan alat suntik 5 ml dengan jarum 18 G. Hasil aspirasi diletakkan dalam cawan petri yang berisi NaCl fisiologis. Penghilangan sel kumulus dilakukan dengan cara dipipet berulang kali. Di bawah *microscope dissecting*, zona pelusida dipisahkan dari oosit secara manual menggunakan spuit tuberculine 1 ml.

Hasil yang didapat dimasukkan dalam vial-vial dan kemudian diidentifikasi proteinnya dengan SDS-PAGE, sehingga didapatkan zona pelusida murni. Zona pelusida (Zp3) yang terkumpul ditempatkan dalam beberapa vial dan dihomogenkan dengan *ultrasonic homogenizer* agar zona pelusida tersebut hancur menjadi partikel yang lebih kecil, kemudian dibagi dalam beberapa vial dengan dosis yang berbeda dan masing-masing vial akan digunakan untuk satu kali perlakuan.

Sebelum suspensi zona pelusida diinjeksikan pada mencit terlebih dahulu ditambahkan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1 : 1 pada penyuntikan pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) pada penyuntikan kedua dan ketiga. Campuran tersebut dikocok dengan menggunakan *disposable syringe* secara berulang-ulang sampai berwarna putih.

3.3.3. Perlakuan Hewan Coba

Mencit betina yang sudah ditempatkan dalam kandang selama 21 hari untuk mendapatkan keseragaman dan untuk mengamati kesehatannya. Penentuan dosis suspensi zona pelusida (ZP3) berdasarkan metode yang dipakai oleh Wagner and Wolf (1977) yaitu bahan atau obat yang belum diketahui dosisnya masing-masing dengan kelipatan dua atau tiga dari dosis sebelumnya.

Setelah masa adaptasi, hewan coba diberi perlakuan dengan penyuntikan subkutan sebagai berikut :

- Kontrol (P0) diberi suntikan NaCl fisiologis 0,1 ml
- Perlakuan I (P1) diberi suntikan suspensi 0,05 ml yang berisi 20 μ g zona pelusida ditambah dengan ajuvan 0,05 ml
- Perlakuan II (P2) diberi suntikan suspensi 0,05 ml yang berisi 40 μ g zona pelusida ditambah dengan ajuvan 0,05 ml.

Pemberian booster dilakukan pada hari ke-14 dan ke-21 setelah penyuntikan pertama, karena titer antibodi tertinggi terhadap protein yang larut dicapai dalam 8-12 hari setelah penyuntikan pertama (Bellanti, 1993).

Setelah masa perlakuan selesai, mencit betina P1 dan P2 dikumpulkan pejantan dengan perbandingan satu jantan dan dua betina selama lima hari. Setiap 24 jam dilakukan pengamatan terjadinya kopulasi dengan melihat adanya sumbat vagina. Pada kontrol tidak dikawinkan.

Pada hari ke-19 setelah dikumpulkan dengan pejantan dilakukan pembedahan pada linea alba. Pembedahan bertujuan untuk mengambil ovarium dan uterus mencit.

3.3.4. Peubah yang diamati

Peubah yang diamati dalam penelitian ini adalah berat ovarium dan berat uterus (gram) serta panjang uterus (cm) pada kontrol dan pada kelompok perlakuan yang tidak bunting.

3.4. Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini dilakukan dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL), data yang terkumpul diuji dengan beda rata-rata (Kusriyningrum, 1989).

BAB IV

HASIL PENELITIAN

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Data yang diperoleh dari penelitian tentang pengaruh pemberian suspensi zona pelusida (Zp3) kambing terhadap biometri ovarium dan uterus pada umur kebuntingan 19 hari dalam tabel 4.1., 4.2. dan 4.3. di bawah ini :

Tabel 4.1. Rata-rata Panjang Uterus Mencit dalam milimeter (mm) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Panjang Uterus
P0	8	21,65 ± 1,39 ^a
P1	8	23,53 ± 3,46 ^a
P2	8	19,12 ± 2,34 ^a

Keterangan : Notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada panjang uterus mencit.

Analisis statistik menggunakan uji F diperoleh hasil $F_{(hitung)} = 1,625$ sedangkan $F_{(tabel)} = 3,47$. Ini berarti $F_{(hitung)} < F_{(tabel)}$ pada taraf signifikan 0,05, sehingga tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap panjang uterus antara perlakuan I dan perlakuan II terhadap perlakuan kontrol.

Tabel 4.2. Rata-rata Berat Uterus Mencit dalam miligram (mg) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Berat Uterus
P0	8	211,67 ± 51,95 ^a
P1	8	222,20 ± 72,36 ^a
P2	8	211,36 ± 73,85 ^a

Keterangan : Notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) pada berat uterus.

Analisis data dengan menggunakan uji F terhadap berat uterus diperoleh hasil $F_{(hitung)} = 0,6818$ sedangkan $F_{(tabel)} = 3,47$. Hal ini berarti $F_{(hitung)} < F_{(tabel)}$ pada taraf signifikan 0,05, sehingga dapat dinyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap berat uterus.

Tabel 4.3. Rata-rata Berat Ovarium dalam miligram (mg) setelah Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing secara Sub Kutan

Perlakuan	Jumlah Hewan Coba	Berat Ovarium Kanan	Berat Ovarium Kiri
P0	8	25,12 ± 5,85 ^a	21,62 ± 6,43 ^a
P1	8	21,33 ± 4,03 ^a	21,22 ± 3,93 ^a
P2	8	18,71 ± 6,04 ^a	20,31 ± 5,58 ^a

Keterangan : Notasi yang sama pada kolom yang sama menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap berat ovarium.

Hasil analisis data dengan menggunakan uji F terhadap berat ovarium diperoleh hasil $F_{(hitung)} = 0,0060$ dari ovarium kanan dan $F_{(hitung)} = 0,0269$ dari ovarium kiri, sedangkan $F_{(tabel)} = 3,47$. Hal ini berarti $F_{(hitung)} < F_{(tabel)}$ pada taraf signifikan 0,05, sehingga dapat dinyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) terhadap berat ovarium.

Dari hasil analisis data terhadap panjang dan berat uterus serta berat ovarium dengan menggunakan uji F diperoleh hasil $F_{(hitung)} < F_{(tabel)}$ pada taraf signifikan 0,05 menunjukkan bahwa penyuntikan suspensi zona pelusida (Zp3) kambing secara subkutan tidak mempengaruhi panjang uterus, berat ovarium dan uterus.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian tentang penyuntikan zona pelusida kambing secara subkutan pada mencit betina dilakukan dengan maksud untuk mengetahui efek samping penggunaan zona pelusida kambing sebagai antifertilitas. Pengujian efek samping dari zona pelusida kambing sebagai antifertilitas diantaranya dapat diketahui dengan pengukuran panjang dan berat uterus serta berat ovarium.

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa pada perlakuan I dengan penyuntikan suspensi zona pelusida kambing dengan dosis 0,05 ml berisi 20 µg zona pelusida (Zp3) kambing tidak mempengaruhi berat ovarium, panjang dan berat uterus. Pada perlakuan II dengan dosis 0,05 ml berisi 40 µg zona pelusida (Zp3) kambing ternyata tidak berpengaruh terhadap berat ovarium, panjang dan berat uterus. Hal tersebut dapat dibuktikan dengan didapatkannya hasil yang menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$) antara berat ovarium, berat dan panjang uterus pada penyuntikan suspensi zona pelusida kambing dengan kontrol.

Imunokontrasepsi mempunyai mekanisme kerja yaitu menutupi reseptor sesuai antigen yang diinjeksikan (Istianah, 2000). Zona pelusida (Zp3) kambing yang diinjeksikan pada mencit betina akan merangsang terbentuknya respon imun dalam tubuh yang akan merangsang timbulnya antibodi spesifik maupun non spesifik. Respon imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dan dapat memberikan respon langsung terhadap antigen (Yuniarti, 2002). Antigen

zona pelusida (Ag-Zp) setelah disuntikkan akan menimbulkan anti Ag-Zp yang dicerminkan sebagai Ig G spesifik (Wood *et al.*, 1982). Penyuntikan zona pelusida akan menghasilkan imunoglobulin terutama Ig A dan Ig G (Jackson *et al.*, 1998) di mana Ig A dan Ig G terdapat pada traktus genetalis betina dan hasil sekresinya. Pada dasarnya antigen zona pelusida yang menimbulkan Ig G spesifik mampu menghambat pertautan spermatozoa di permukaan zona dan mengadakan pengerasan konsistensi zona (Crightton, 1983). Antibodi Ig G pada Zp3 dalam sirkulasi mungkin mempunyai peranan besar pada antifertilitas yang ditunjukkan dengan antibodi Ig G yang dapat menembus folikel ovarium dan berikatan pada zona pelusida secara *in vivo* (Xin Zhang *et al.*, 1997).

Antibodi anti-zona yang timbul diduga menyebabkan tertutupnya reseptor spesifik terhadap zona pelusida mencit yang menyebabkan terbentuknya imunopresipitat pada permukaan luar zona pelusida dan menutupi tempat pengikatan sperma sehingga fertilisasi tidak terjadi (Yuniarti, 2002). Imunokontrasepsi menggunakan zona pelusida tidak menimbulkan perubahan siklus hormon reproduksi dan perkembangan folikel (Wood *et al.*, 1982), sehingga pada penelitian ini tidak terjadi perubahan biometri ovarium dan uterus.

Bagian dari zona pelusida yang bekerja paling utama pada fertilisasi dan pertama kali bereaksi terhadap spermatozoa pada reaksi zona adalah Zp3 yang merupakan glikoprotein mayor dari zona pelusida (Xin Zhang *et al.*, 1997). Pada penelitian ini yang digunakan sebagai patokan penentuan dosis adalah dosis Zp3 karena diduga antibodi anti-Zp3 yang bekerja pertama kali. Apabila antibodi anti-Zp3 sudah bekerja maka dapat merusak reseptor permukaan zona pelusida yang

berfungsi sebagai reseptor pengenalan terhadap spermatozoa, sehingga apabila ada spermatozoa masuk ke tempat fertilisasi tidak akan mampu lagi mengenali oosit. Oosit tidak akan terbuahi oleh spermatozoa sehingga tidak terjadi kebuntingan (Setyawan, 2002).

Faktor-faktor yang mempengaruhi biometri ovarium dan uterus adalah spesies, umur, fase siklus birahi, status reproduksi betina, jumlah anak yang dilahirkan, hormon-hormon dari kelenjar pituitari (FSH dan LH), kista.

Bentuk maupun ukuran ovarium dan uterus berbeda-beda menurut umur, banyaknya anak yang dilahirkan (Hardjopranto, 1995), spesies dan fase siklus birahi (Ismudiono, 1999). Ukuran uterus betina yang pernah melahirkan lebih besar dua kali atau lebih daripada betina yang belum pernah melahirkan. Ukuran uterus hewan beranak banyak dapat menjadi lebih besar lebih cepat daripada hewan beranak tunggal (Neimann, 1997).

Ukuran ovarium tergantung pada status reproduksi betina (dewasa kelamin, bunting, sudah pernah melahirkan). Pertumbuhan dan perkembangan histologis ovarium dikontrol oleh hormon-hormon yang berasal dari kelenjar pituitari (Nalbandov, 1990).

Kegiatan fisiologis kelenjar ovarium sangat tergantung pada aktifitas kelenjar hipofisa anterior. Hormon gonadotropin dari hipofisa anterior adalah *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) yang mendorong pertumbuhan dan terjadinya folikel-folikel yang ada pada ovarium (Neimann, 1997).

Fungsi utama FSH adalah pertumbuhan dan pematangan folikel de Graaf di dalam ovarium, tetapi tidak menyebabkan ovulasi. LH bekerjasama dengan FSH untuk menstimuler pematangan folikel dan pelepasan estrogen. Sesudah pematangan folikel, LH menyebabkan ovulasi dengan menggetak pemecahan dinding sel dan pelepasan ovum. LH juga ikut berpengaruh terhadap pembentukan korpus luteum yang berasal dari folikel yang sudah pecah karena ovulasi. Pancaran FSH dari hipofisis anterior sangat dipengaruhi oleh pancaran *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) yang secara langsung dipengaruhi oleh keberadaan progesterone (Hafez, 1993).

Apabila kadar LH sebelum ovulasi tidak cukup besar, ovulasi tidak akan terjadi. Tidak adanya ovulasi menyebabkan kegagalan perkembangan korpus luteum dan akibatnya hampir tidak ada sekresi progesteron pada seluruh siklus birahi. Karena tidak adanya progesteron pada siklus birahi, maka penebalan endometrium uterus tidak terjadi (Guyton, 1992). Hal ini terlihat dari hasil penelitian ini, dimana tidak terjadi perubahan berat uterus.

Apabila hipofisa anterior gagal melepaskan LH dalam darah dengan kadar yang cukup, tetapi FSH dihasilkan dalam kadar normal, maka pada ovarium akan terjadi pertumbuhan folikel yang tidak normal. Folikel tidak tumbuh menjadi folikel de Graaf dan tidak terjadi ovulasi. Folikel yang tidak mengalami ovulasi akan bertambah banyak dan terbentuknya folikel ganda pada permukaan ovarium sehingga dapat menyebabkan terjadinya kista ovarium (Hardjopranto, 1995). Kista ini dapat menghambat fungsi ovarium dan dapat menyebabkan penambahan berat ovarium (Ressang, 1984). Pada penelitian ini tidak terjadi kista karena untuk

terbentuknya kista membutuhkan waktu yang lama, sehingga tidak terjadi penambahan berat ovarium.

Estrogen dalam keadaan normal akan merangsang pertumbuhan dan mempengaruhi perubahan fisiologis alat kelamin, tingkah laku seksual, dan siklus birahi pada betina. Estrogen beraksi terhadap uterus untuk meningkatkan massa endometrium dan miometrium dalam bentuk hiperplasia dan hipertropi (Ismudiono, 1999). Estrogen mampu menurunkan pembentukan FSH dan LH yang selanjutnya dapat menghilangkan sekresi dari hormon-hormon gonad normal (Guyton, 1992).

Penggunaan estrogen dosis besar dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan otot uterus menjadi lunak dan mengalami hipertropi. Perubahan tersebut pada umumnya bersifat reversibel. Hipertropi terjadi karena meningkatnya tebal dinding uterus akibat penambahan jumlah sel karena meningkatnya mitosis dan bertambah besarnya volume sel (Suherman, 1995). Hipertrofi uterus disebabkan oleh sekresi estrogen dan progesteron dalam jumlah besar dimana estrogen menyebabkan proliferasi sel tambahan pada endometrium uterus serta progesteron menyebabkan pembengkakan dan pembentukan sekresi endometrium Guyton (1992). Penyuntikan suspensi zona pelusida pada penelitian ini tidak menimbulkan perubahan pada siklus hormon reproduksi karena bekerja langsung pada target organ sehingga tidak terjadi hipertrofi pada uterus, dimana pada penelitian ini tidak terjadi perubahan berat uterus.

Metode imunokontrasepsi menggunakan zona pelusida kambing dengan dosis 20 μ g dan 40 μ g Zp3 dapat menurunkan angka kebuntingan serta

menurunkan jumlah janin pada mencit (*Mus musculus*) dalam satu periode kebuntingan (Yuniarti, 2002). Suspensi zona pelusida bekerja secara spesifik pada gamet sehingga tidak mengganggu kerja endokrin (Castle and Dean, 1996). Imunokontrasepsi menggunakan zona pelusida tidak menimbulkan perubahan pada siklus hormon reproduksi dan perkembangan folikel (Wood *et al.*, 1982). Imunokontrasepsi menggunakan zona pelusida (Zp3) kambing dengan dosis 20 µg dan 40 µg Zp3 tidak menimbulkan perubahan siklus birahi dan berat badan mencit (*Mus musculus*) betina (Setyawan, 2002), sehingga penyuntikan suspensi zona pelusida kambing pada penelitian ini tidak menimbulkan efek samping pada biometri ovarium dan uterus mencit (*Mus musculus*) betina.

BAB VI
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida kambing secara sub kutan pada hari ke-1, 14 dan 21 setelah adaptasi maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pemberian suspensi zona pelusida kambing dosis 0,05 ml berisi 20 µg dan 40 µg Zp3 sebagai bahan baku preparat imunokontrasepsi ternyata tidak mempengaruhi berat ovarium, berat uterus dan panjang uterus.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil yang telah diperoleh, maka melalui penelitian ini diajukan beberapa saran yaitu :

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kemungkinan efek samping yang lain, seperti perubahan histopatologi uterus dan ovarium.
2. Suspensi zona pelusida mungkin dapat digunakan sebagai bahan vaksin kontrasepsi yang baik jika terbukti dapat mencegah terjadinya kebuntingan dan tidak menyebabkan efek samping.

RINGKASAN

DITE MARTUSTHI KARTIKA LAKSMI. Pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida di bawah bimbingan Husni Anwar., Drh. sebagai pembimbing pertama dan Benyamin Chr. Tehupuring, M.Si., Drh. sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh penyuntikan suspensi zona pelusida kambing terhadap biometri ovarium dan uterus.

Penelitian ini dilakukan dengan model percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba yang digunakan adalah 24 ekor mencit betina berumur 2,5-3 bulan yang sudah pernah melahirkan dan dibagi secara acak menjadi tiga perlakuan dan delapan ulangan. Pada kontrol diberikan 0,1 ml NaCl fisiologis tanpa suspensi zona pelusida kambing. Perlakuan yang diberikan pada perlakuan I dan II berupa 0,05 ml suspensi zona pelusida kambing dengan dosis berturut-turut yaitu setara 20 μg dan 40 μg Zp3 dalam 0,05 ml *complete freund adjuvant* (CFA) pada penyuntikan pertama dan *incomplete freund adjuvant* (IFA) pada booster, perlakuan tersebut disuntikkan pada hari ke-1, 14 dan 21 setelah masa adaptasi dengan menggunakan *disposable syringe* 1ml.

Pada hari ke-26, mencit betina perlakuan dikumpulkan dengan mencit jantan dengan perbandingan satu mencit jantan dan dua mencit betina sampai terjadi kopulasi, sedangkan pada kontrol tidak dilakukan perkawinan. Pengambilan ovarium dan uterus dilakukan dengan laparotomi pada hari ke-19 sejak umur kebuntingan sejak diketahui telah terjadi kopulasi yang ditandai

dengan adanya sumbat vagina. Ovarium dan uterus ditimbang dengan timbangan mikro dalam keadaan segar, sedangkan panjang uterus diukur dengan alat pengukur panjang dalam keadaan segar.

Hasil dari serangkaian analisis data yang telah dilakukan menunjukkan bahwa perlakuan penyuntikan suspensi zona pelusida kambing dalam *complete freund adjuvant* pada penyuntikan pertama dan *incomplete freund adjuvant* pada penyuntikan booster dengan dosis setara 20 µg dan 40 µg Zp3 tidak berpengaruh terhadap berat ovarium, berat uterus dan panjang uterus mencit.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, R.J., M. Paterson, *and* M. van Duin. 1996. The Potential of the Zona Pellucida as a Target for Immunocontraception. *Am J Reprod Immunol.* 35(3) : 175-80.
- Astika, G.N. 1998. Isolasi dan Identifikasi Kandungan Aktif Kulit Batang *Avicena Marina (Forsk) Vierch* yang Berkhasiat Antifertilitas pada mencit betina. Disertasi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- 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 Zona Pellucida : Implications for Immunocontraceptive. *J. Reprod. Fertil.* 50 : 1-8.
- Epifano, O. *and* J. Dean 1994. Biology and Structure of Zona Pellucida : A Target for Immunocontraception, *Hum. Reprod.* 6(3) : 319-30.
- Feng, H., Sandlow, J.I., Sparks, A.E., *and* Sandra, A. 1999. Development of Immunocontraception Vaccine. Current Status. *J Reprod Med.* 44(9): 756-65.
- Goodman, J.W. 1994. Biology and Structure of the Zona Pellucida : A Target for Immunocontraception. *Hum Reprod.* 6(3) :319-30.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CAB International. UK.
- Greenhouse, S., P.E. Castle *and* J. Dean. 1999. Antibodies to Human ZP3 Reversible Contraception in Transgenic Mice with "Humanized" Zonae Pellucidae. *Hum. Reprod.* 14(3) : 593-600.
- Guyton, A.C. 1988. *Buku Teks Fisiologi Kedokteran*. Bagian 1. Edisi 5. Diterjemahkan oleh Adji Dharma dan P. Lukmanto. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Guyton, A.C. 1992. Buku Teks Fisiologi Kedokteran. Bagian 2. Edisi 5. Diterjemahkan oleh Adji Dharma dan P. Lukmanto. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Hamamah, S., D. Royere, M. Jean, and H. Lucas. 1997. The Future of Male Contraception by Preventing Gamete Interaction. *Hum. Reprod.* 25(2): 136-90.
- Harjopranto, S. 1995. Ilmu Kemajiran. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hasegawa, A., K. Koyama and S. Isojima. 1991. Isolation of Sour Major Glycoprotein Families (Zp1, Zp2, Zp3, Zp4) of Porcine Zona Pellucida and Characterization of Antisera Raised to Each Glycoprotein Family. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zashi.* 43(2) : 221-6.
- Ismudiono. 1999. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Jackson, R.J., Deborah, J.M., Lyn, A.H., and Ramshaw, A. 1998. Infertility In Mice Induced Recombinant Ectomelia Virus Expressing Mouse Zona Pellucida Glycoprotein. *Biology of Reprod.* 58 :152-159.
- Keefe, D., P. Tran, C. Pellegrini, and R. Aldenborough. 1997. Polarized Light Microscopy and Digital Image Processing Identify a Multilaminar Structure of the Hamster Zona Pellucida. *Hum Reprod.* 12(6):1250.
- Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lee, E.B. and H.C. Chi. 1985. Female Antifertility of Natural Products. In *Proceeding from the UNESCO Regional Work Shop*. Seoul. November. PP : 18-22.
- Mc Cartney, C.A. and K.E. Mate. 1999. Cloning and Characterisation of a Zona Pellucida 3 cDNA from a Marsupial, the Brushtail Possum *Trichurus vulpecula*. *Macquarie University Australia. Zygote.* Feb; 7(1) : 1-9.

- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi dan Kebidanan pada Mamalia dan Unggas. Terjemahan K. Sunarya. Edisi Ketiga. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Naz, R.K., A. Sacco, O. Sigh, and R. Pal. 1995. Development of Contraceptive Vaccine for Human Using Antigens Derived from Gametes (Spermatozoa and Zona Pellucida) and Hormones (Human Chorionic Gonadotropin) : Current Status. Hum Reprod. 1(1) : 1-18.
- Neimann-Sorensen, A. and D.E. Tribe. 1993. Reproduction In Domestic Animal, World Animal Science, B9. Publisher Amsterdam, Netherlands.
- Pabbadja, S. 1992. Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera untuk Kader. Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Partodihardjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Penerbit Mutiara. Jakarta.
- Raghupaty, R. and Talwar, G.P. 1992. Vaccines against Fertility. Curr Opin Immunol. 4(5) : 597-602.
- Rahayu, L. 1988. Efek Antifertilitas *Salamum namosum* pada Mencit Betina. Thesis. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Ressang, A.A. 1984. Patologi Khusus Veteriner, Edisi 2. Team Leader IFAD Project. Denpasar.
- Seryawan, B. 2002. Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida (Zp3) Oosit Kambing Terhadap Perubahan Siklus Birahi dan Berat Badan Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Shimizu, S., M. Ito, and J. Dean. 1982. Biochemical and Biophysical research Communication, 109 : 449-454.
- Skinner, S.M., Schwoebel E.S., Prasad S.V., Oguna M., and Dunbar B.S. 1999. Mapping of Dominant B-Cell Epitopes of A Human Zona Pellucida Protein (ZP1). Biol Reprod Dec; 61(6) : 1373-80.
- Smith, J.B. and S. Mangkoewidjojo. 1988. Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Subowo. 1993. Imunologi. Penerbit Angkasa. Jakarta.

- Suherman, S.K. 1995. Estrogen, Antiestrogen, Progestin dan Kontrasepsi Hormonal. Farmakologi dan Terapi. Edisi 4. Gaya Baru Jakarta.
- Talevi, R., R. Gualtieri, G. Tartaglione, and A. Fortunato, A. 1997. Heterogeneity of the Zona Pellucida Carbohydrate Distribution in Human oocytes Failing to Fertilization in vitro. Hum Reprod. 12(12) :273-80.
- Tizard, I. 1988. Veterinary Immunology in Introduction. 3rd Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Toelihere, M.R. 1981. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Wodzicka-Tomazewska, M., I Ketut Utama, I Gede Putu, dan D.T. Chaniago. 1991. Reproduksi, Tingkah Laku dan Produksi Ternak di Indonesia. Penerbit PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Wood, D.M., C. Liu, and D.W. Richardson. 1982. Gamete Research. T :271-281.
- Xin Zhang, Ya-Huan Lou, M. Koopman, T. Dogget, K.S.K. Tung, and R. Curtiss. 1997. Antibody Responses and Infertility in Mice Following Oral Immunization with Attenuated *Salmonella typhimurium* Expressing Recombinant Murine ZP3. Biology of Reproduction. 56 : 33-41.
- Yuniarti, D. 2002. Pengaruh Penyuntikan Zona Pelusida (Zp3) Kambing terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Janin Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisis Statistik Dengan Uji F Untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Panjang Uterus Dalam Satuan Sentimeter (cm)

Ulangan	Kontrol (P0)	Perlakuan I (P1)	Perlakuan II (P2)	Total
1	2,13	1,76	2,00	
2	2,49	2,03	2,28	
3	2,06	2,68	1,62	
4	2,08	2,60	1,60	
5	2,06	2,28	2,02	
6	2,18	2,79	2,10	
7	2,16	2,44	1,86	
8	2,16	2,25	1,82	
Rata-rata	2,165	2,35375	1,9125	
Jumlah data	8	8	8	24
Total	17,32	18,83	15,30	51,45

Rumus :

$$FK = \text{Faktor Koreksi} = \frac{y_{..}^2}{N}$$

$$JKT = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - FK$$

$$JKP = \sum_{i=1}^t \frac{y_i^2}{n} - FK$$

$$JKS = JKT - JKP$$

$$KTP = \frac{JKP}{t-1}$$

$$KTS = \frac{JKS}{t(n-1)}$$

$$F_{hitung} = \frac{KTP}{KTS}$$

Keterangan :

$y_{..}$ = total keseluruhan

N = total jumlah data

n = ulangan

t = perlakuan

y_{ij} = biometri ovarium dan uterus yang menerima perlakuan ke i dari hewan ke j

y_i = panjang uterus ke i

db = derajat bebas

$$db \text{ perlakuan} = t - 1 = 3 - 1 = 2$$

$$db \text{ sisa} = t(n - 1) = 3(8 - 1) = 21$$

$$db \text{ total} = tn - 1 = (3 * 8) - 1 = 23$$

Penghitungan :

$$FK = \frac{(51,45)^2}{24} = 110,2959$$

$$JKT = 2,13^2 + \dots + 1,82^2 - 110,2959 = 5,843$$

$$JKP = \frac{(17,32)^2 + (18,83)^2 + (15,30)^2}{8} - 110,2959 = 0,78$$

$$JKS = 5,843 - 0,78 = 5,063$$

$$KTP = \frac{0,78}{2} = 0,39$$

$$KTS = \frac{5,063}{21} = 0,24$$

$$F_{hitung} = \frac{0,39}{0,24} = 1,625$$

Sidik Ragam

Sumber Keragaman (S.K.)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (J.K.)	Kuadrat Tengah (K.T.)	F _(hitung)	F _(tabel)	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	0,78	0,39	1,625	3,47	5,78
Sisa	21	5,063	0,24			
Total	23	5,483				

Ternyata bahwa kontrol, perlakuan I, perlakuan II memberikan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap panjang uterus karena $F_{(hitung)} < F_{(tabel)}$.

Lampiran 2. Analisis Statistik Dengan Uji F Untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Berat Uterus Dalam Satuan Gram (g)

Ulangan	Kontrol (P0)	Perlakuan I (P1)	Perlakuan II (P2)	Total
1	0,2569	0,1651	0,1621	
2	0,1880	0,1914	0,2922	
3	0,2932	0,2064	0,2291	
4	0,2146	0,1896	0,1622	
5	0,1814	0,1358	0,1176	
6	0,1323	0,2278	0,1525	
7	0,2482	0,3246	0,3237	
8	0,1788	0,3369	0,2515	
Rata-rata	0,211675	0,2222	0,2113625	
Jumlah data	8	8	8	24
Total	1,694	1,7776	1,6909	5,1619

Penghitungan :

$$FK = \frac{(5,1619)^2}{24} = 1,1102$$

$$JKT = 0,2569^2 + \dots + 0,2515^2 - 1,1102 = 0,0944$$

$$JKP = \frac{(1,694)^2 + (1,7776)^2 + (1,6909)^2}{8} - 1,102 = 0,0006$$

$$JKS = 0,0944 - 0,0006 = 0,0938$$

$$KTP = \frac{0,0006}{2} = 0,0003$$

$$KTS = \frac{0,0938}{21} = 0,044$$

$$F_{hitung} = \frac{0,0003}{0,044} = 0,6818$$

Sidik Ragam

Sumber Keragaman (S.K.)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (J.K.)	Kuadrat Tengah (K.T.)	F _(hitung)	F _(tabel)	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	0,0006	0,0003	0,6818	3,47	5,78
Sisa	21	0,0938	0,044			
Total	23	0,0944				

Dapat disimpulkan bahwa perlakuan yang diberikan menunjukkan perbedaan tidak nyata ($P > 0,05$) pengaruhnya terhadap berat uterus.

Lampiran 3. Analisis Statistik Dengan Uji F Untuk Melihat Pengaruh Penyuntikan Suspensi Zona Pelusida Kambing Terhadap Berat Ovarium Dalam Satuan Gram (g)

A. Ovarium Kanan

Ulangan	Kontrol (P0)	Perlakuan I (P1)	Perlakuan II (P2)	Total
1	0,0160	0,0299	0,0172	
2	0,0266	0,0181	0,0298	
3	0,0274	0,0164	0,0174	
4	0,0143	0,0208	0,0232	
5	0,0288	0,0233	0,0193	
6	0,0277	0,0208	0,0168	
7	0,0215	0,0203	0,0204	
8	0,0178	0,0211	0,0086	
Rata-rata	0,0225125	0,0213375	0,0187125	
Jumlah data	8	8	8	24
Total	0,1801	0,1707	0,1527	0,5035

Penghitungan :

$$FK = \frac{(0,5035)^2}{24} = 0,0106$$

$$JKT = 0,0160^2 + \dots + 0,0086^2 - 0,0106 = 0,1764$$

$$JKP = \frac{(0,1801)^2 + (0,1707)^2 + (0,1527)^2}{8} - 0,0106 = 0,0001$$

$$JKS = 0,1764 - 0,0001 = 0,1763$$

$$KTP = \frac{0,0001}{2} = 0,00005$$

$$KTS = \frac{0,1763}{21} = 0,0084$$

$$F_{hitung} = \frac{0,00005}{0,0084} = 0,0060$$

Sidik Ragam

Sumber Keragaman (S.K.)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (J.K.)	Kuadrat Tengah (K.T.)	F _(hitung)	F _(tabel)	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	0,0001	0,00005	0,0060	3,47	5,78
Sisa	21	0,1763	0,0084			
Total	23	0,1764				

Didapat dari hasil perhitungan bahwa $F_{hitung} < F_{tabel}$, hal ini berarti tidak ada perbedaan nyata ($P > 0,05$) diantara perlakuan.

B. Ovarium Kiri

Ulangan	Kontrol (P0)	Perlakuan I (P1)	Perlakuan II (P2)	Total
1	0,0138	0,0241	0,0193	
2	0,0288	0,0169	0,0267	
3	0,0278	0,0159	0,0173	
4	0,0163	0,0242	0,0204	
5	0,0251	0,0230	0,0209	
6	0,0273	0,0240	0,0213	
7	0,0203	0,0168	0,0275	
8	0,0136	0,0249	0,0096	
Rata-rata	0,022625	0,021225	0,020315	
Jumlah data	8	8	8	24
Total	0,1730	0,1698	0,1630	0,5058

Penghitungan :

$$FK = \frac{(0,5058)^2}{24} = 0,01066$$

$$JKT = 0,0138^2 + \dots + 0,0096^2 - 0,01066 = 0,07467$$

$$JKP = \frac{(0,1730)^2 + (0,1698)^2 + (0,1630)^2}{8} - 0,01066 = 0,00012$$

$$JKS = 0,07467 - 0,00012 = 0,07455$$

$$KTP = \frac{0,00012}{2} = 0,00006$$

$$KTS = \frac{0,07455}{21} = 0,00355$$

$$F_{hitung} = \frac{0,00006}{0,00355} = 0,002690$$

Sidik Ragam

Sumber Keragaman (S.K.)	Derajat Bebas (db)	Jumlah Kuadrat (J.K.)	Kuadrat Tengah (K.T.)	$F_{(hitung)}$	$F_{(tabel)}$	
					0,05	0,01
Perlakuan	2	0,00012	0,00006	0,02690	3,47	5,78
Sisa	21	0,07455	0,00355			
Total	23	0,07467				

Dari hasil perhitungan diperoleh $F_{(tabel)} > F_{(hitung)}$, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak atau tidak terdapat perbedaan nyata ($P > 0,05$) antara kontrol dan perlakuan.