

SKRIPSI

**IDENTIFIKASI REAKSI PROTEIN RESEPTOR PADA
ZONA PELUSIDA DAN SPERMATOZOA KAMBING
DENGAN TEKNIK IMUNOFLUORESEN**



Oleh :

IDIL LAR

LABUAN BAJO – NUSA TENGGARA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003**

**IDENTIFIKASI REAKSI PROTEIN RESEPTOR PADA
ZONA PELUSIDA DAN SPERMATOZOA KAMBING
DENGAN TEKNIK IMUNOFLUORESEN**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh

IDIL LAR

060032839

Menyetujui

Komisi Pembimbing,



Sri Mulyati, M.Kes., Drh

Pembimbing Pertama



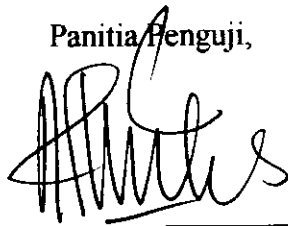
Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh

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,

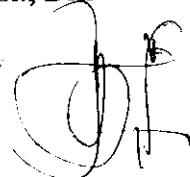


Abdul Samik, M.Si., Drh



Jola Rahmahani, M.Kes., Drh

Ketua



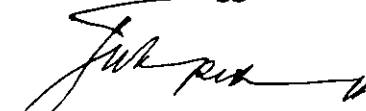
Mas'ud Hariadi, M.Phil., Ph.D., Drh

Sekretaris



Sri Mulyati, M.Kes., Drh

Anggota



Tjuk Imam Restiadi, M.Si., Drh

Anggota

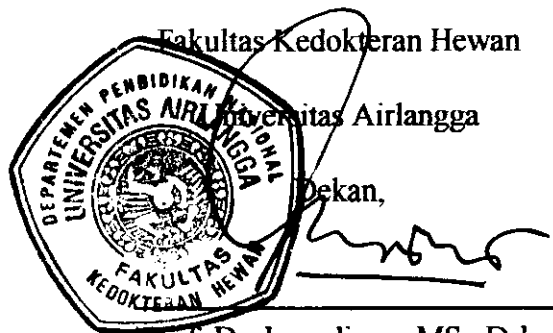
Anggota

Surabaya, 14 Nopember 2003

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Ismudiono, MS., Drh

NIP 130687297

IDENTIFIKASI REAKSI PROTEIN RESEPTOR PADA ZONA PELUSIDA DAN SPERMATOZOA KAMBING DENGAN TEKNIK IMUNOFLUORESEN

IDIL LAR

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui terjadinya ikatan antara zona pelusida dengan antibodinya dan antara homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing.

Penelitian ini menggunakan spermatozoa, homogenat zona pelusida, antibodi hasil imunisasi mencit dengan zona pelusida 3 (ZP₃) kambing (antibodi primer /Ab₁) dan antibodi anti Ig G mencit yang dilabel *fluorescein isothiocyanate* FITC (antibodi sekunder/Ab₂). Sebagai kontrol positif, homogenat zona pelusida ditambah antibodi primer (Ab₁) dan ditambah antibodi anti Ig G mencit (Ab₂), sedangkan sebagai kontrol negatif, spermatozoa tanpa ditambah homogenat zona pelusida, ditambah antibodi primer (Ab₁) dan ditambah antibodi sekunder (Ab₂). Keberadaan reseptor fertilisasi pada spermatozoa diketahui dengan menambahkan spermatozoa dengan homogenat zona pelusida ditambah antibodi primer (Ab₁) dan antibodi sekunder (Ab₂).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemeriksaan dengan mikroskop fluoresen pada pembesaran 400 kali, kontrol positif berfluoresensi. Kontrol negatif karena tanpa penambahan homogenat zona pelusida tidak menyebabkan spermatozoa berfluoresensi. Fluoresensi terjadi pada sediaan spermatozoa ditambah homogenat zona pelusida ditambah antibodi primer (Ab₁) dan ditambah antibodi sekunder (Ab₂).

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa antibodi hasil imunisasi zona pelusida 3 (ZP₃) kambing pada mencit (Ab₁) dapat terikat pada homogenat zona pelusida dan homogenat zona pelusida dapat dikenali oleh membran plasma spermatozoa. Hal ini berarti antibodi hasil imunisasi zona pelusida 3 (ZP₃) kambing pada mencit dapat menghambat terjadinya fertilisasi.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas berkat dan rahmat-Nya makalah skripsi yang berjudul "Identifikasi Reaksi Protein Reseptor pada Zona Pelusida dan Spermatozoa Kambing dengan Teknik Imunofluoresen" bisa tersusun dan terlaksana.

Satu percobaan telah penulis lakukan untuk mengetahui terjadinya ikatan antibodi hasil imunisasi ZP₃ mencit pada homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing. Manfaat hasil penelitian ini adalah dapat memberikan informasi mengenai terjadinya ikatan antibodi zona pelusida kambing dengan homogenat zona pelusida sebagai reseptor dari spermatozoa kambing dalam mencegah fertilisasi.

Rasa hormat dan dengan tulus ikhlas penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.
2. Ibu Sri Mulyati, M.Kes., drh. selaku Dosen Pembimbing pertama dan Bapak Tjuk Imam Restiadi, M.Si., drh. selaku Dosen Pembimbing kedua.
3. Bapak Imam Mustofa, M.Kes., drh dan Bapak Dr. Fedik Abdul Rantan., drh. yang telah memberikan bimbingan dan dorongan moril.
4. Ayah, ibu, kakak, adik, saudara-saudaraku yang ada di desa Waewako, Flores atas dorongan semangat, motivasi, nasehat dan doanya.

5. Doddy, mbak Ida, mbak Surti, Ancas, dan teman-teman transfer angkatan 2000 serta teman-teman angkatan 98 yang membantu menyelesaikan skripsi ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu dalam penyusunan makalah skripsi ini.

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

Surabaya, September 2003

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
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. Definisi Operasonal	5
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1. Zona Pelusida	6
2.2. Spermatozoa	9
2.3. Antigen dan Imunogen	9
2.4. Antibodi	10
2.5. Respon Imun	10
2.6. Antifertilitas	11
2.7. Kontrasepsi	12
2.8. Imunokontrasepsi	12
III. MATERI DAN METODE.....	14
3.1. Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.2. Bahan dan Alat Penelitian.....	14

3.2.1. Bahan Penelitian.....	14
3.2.2. Alat Penelitian.....	15
3.3. Metode Penelitian.....	16
3.3.1. Persiapan.....	16
3.3.2. Pengambilan Semen Kambing.....	16
3.3.3. Preparasi Zona Pelusida.....	16
3.3.4. Pembuatan Antibodi Anti Zona Pelusida.....	17
3.4. Fluoresen Antibodi Teknik (FAT)	18
3.4.1. Direck FAT.....	18
3.4.2. Indireck FAT	18
3.5. Metode Pembuatan Preparat.....	19
3.5.1. Gelas Obyek I.....	20
3.5.2. Gelas Obyek II.....	20
3.5.3. Gelas Obyek III.....	21
IV. HASIL PENELITIAN.....	22
4.1. Gelas Obyek I	22
4.2. Gelas Obyek II.....	23
4.3. Gelas Obyek III.....	23
V. PEMBAHASAN.....	25
VI KESIMPULAN DAN SARAN.....	29
RINGKASAN.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	32

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Metode Pembuatan Preparat Imunofluoresen.....	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Homogenat zona pelusida yang berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.....	22
2. Spermatozoa yang tidak berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.....	23
3. Spermatozoa yang berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.....	24

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. Pada bidang kedokteran hewan telah dilaksanakan pengendalian populasi hewan dengan menggunakan metode kontrasepsi yang hampir sama dengan manusia yang bertujuan untuk menurunkan populasi satwa liar (kucing, anjing, kera) sebagai penyebab dan penyebaran penyakit zoonosis. Preparat kontrasepsi yang telah dipakai secara luas dewasa ini adalah metode kontrasepsi pil, suntikan depo derivat progesteron, alat kontrasepsi dalam rahim (AKDR), operasi (vasektomi, tubektomi) dan alat kontrasepsi fisik (diafragma, kondom, dan lain-lain) bersifat mengganggu fungsi fisiologis endokrin pada poros hipotalamus, hipofisa dan ovarium. Kelainan yang ditimbulkan bervariasi dapat berupa timbul bercak hitam diwajah, kegemukan, payudara membesar, tidak terjadi haid dan gangguan saluran pencernaan seperti mual, muntah dan kembung. Pada kontrasepsi oral mempunyai kontraindikasi bagi wanita yang berusia diatas 32 tahun, perokok berat, penderita trombosis, penyakit pembuluh darah yang meradang dan degeneratif, ikhterus gangguan fungsi hati dan empedu (Sartono, 1996).

Salah satu metode kontrasepsi yang dikembangkan saat ini adalah metode yang langsung bekerja pada target organ, yaitu metode imunokontrasepsi atau imunisasi kontrasepsi dengan memanfaatkan potensi protein antigenik gamet.

Dengan metode imunokontrasepsi diharapkan fertilisasi dapat dicegah tanpa mengganggu fungsi fisiologis hormonal pada sistem reproduksi. Imunisasi kontrasepsi mempunyai spesifik tinggi, efek samping rendah, harga yang lebih murah dan pemakaiannya tidak sesering alat kontrasepsi yang ada saat ini (Naz *et al.*, 1995). Imunokontrasepsi ini menggunakan bahan yang bersifat antigenik (Ag), salah satunya adalah zona pelusida. Penggunaan zona pelusida sebagai imunokontrasepsi merupakan pilihan yang tepat tanpa ada kekhawatiran gangguan atau bahaya pada sistem reproduksi (Castle dan Dean, 1996; Gupta *et al.*, 1997).

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). Zona pelusida adalah lapisan glikoprotein yang terletak diluar membran vitelin yang mengelilingi oosit dan intinya. Umumnya zona pelusida terdiri dari glikoprotein yang mempunyai reseptor spermatozoa dan terminal unik galaktose dengan berat melekul sekitar 200.000 Dalton (Shimizu, 1982), sedangkan zona pelusida mamalia diketahui mengandung tiga macam glikoprotein trigliserida, yaitu ZP₁, ZP₂ dan ZP₃ dengan berat melekul masing-masing 137, 92 dan 62 kDa (Mc Cartney dan Mate, 1999). Protein yang mempunyai berat melekul lebih besar dari 1000 Dalton adalah antigen (Tizard, 1988), sehingga zona pelusida mempunyai sifat sebagai antigen (Crightton, 1983).

Zona pelusida dengan melekul protein dan glikogen penyusunnya dapat bertindak sebagai imunogen yang merupakan kandidat bahan dasar dari pembuatan imunisasi kontrasepsi pada wanita. Imunisasi hewan betina kambing dengan 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). Menurut Wasarman (1990) yang dikutip oleh Bazer *et al.*, (1993), perlekatan kepala spermatozoa ke zona pelusida diatur oleh reseptor pada permukaan zona pelusida. Perlakuan ovum dengan anti- zona pelusida atau dengan enzim tripsin dapat menyebabkan blokade perlekatan spermatozoa atau pengikatan pada zona pelusida. Ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida dapat juga dihambat bila dilakukan *pre treatment* spermatozoa dengan *anti sperm antibody* atau glikoprotein yang diekstraksi dari zona pelusida. Antibodi terhadap spermatozoa atau zona pelusida dapat menutup seluruh reseptor pada permukaan spermatozoa dan zona pelusida.

Beberapa studi terbaru membuktikan pengaruh zona pelusida dengan melakukan penyuntikan pada mencit kemudian diambil serumnya mempunyai imunogenitas yang kuat dan efektif dalam menghambat fertilisasi *in vivo* dan *in vitro*, sehingga zona pelusida dianggap sebagai imunisasi kontrasepsi yang menjanjikan (Tsunoda dan Chang, 1978).

Antibodi yang timbul terhadap glikoprotein zona pelusida yang dimurnikan dari satu spesies tertentu menunjukkan derajat reaksi silang imunologis yang berbeda-beda dengan glikoprotein zona pelusida dari spesies lain (Sacco *et al.* ..

1981). Sifat itu telah menyebabkan kemungkinan dilakukannya imunisasi heterolog.

1.3. Perumusan Masalah

1. Apakah antibodi zona pelusida kambing mampu berikatan dengan homogenat zona pelusida kambing yang dapat dilihat dengan mikroskop fluoresen ?
2. Apakah homogenat zona pelusida kambing mampu berikatan dengan spermatozoa kambing yang dapat dilihat dengan mikroskop fluoresen ?

1.4 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui terjadinya ikatan antara zona pelusida dengan antibodinya dan antara homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing.

1.5. Manfaat Hasil Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai terjadinya ikatan antibodi zona pelusida kambing sebagai reseptor dari homogenat zona pelusida dalam mencegah fertilisasi.

1.6. Definisi Operasional

Complete Freund's Adjuvant (CFA) yang mengandung antigen zona pelusida 3 (ZP₃) kambing untuk imunisasi pertama dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) untuk booster. Menurut Tizard (1988) CFA yang digunakan mengandung dinding sel mycobacterium yang berfungsi untuk meningkatkan antibodi terhadap antigen spesifik. Menurut Bellanti (1993) adjuvant bila disuntikkan bersama-sama antigen dapat memperbesar respon imun pada binatang terhadap antigen tersebut dan penyimpanan antigen dalam tubuh menjadi lebih lama.

Antibodi primer (Ab₁) adalah serum hasil imunisasi mencit dengan goat ZP₃. Antibodi anti imunoglobulin G (Ig G) mencit yang dilabel *flourescein isothiocyante* (FITC) (Ab₂) adalah senyawa kuning yang mudah dikonjugasikan pada imunoglobulin dengan tidak mengganggu reaktifitasnya. Bila disinari dengan sinar ultraviolet yang tidak tampak dengan panjang gelombang 290 dan 145 μm zat warna akan memancarkan kembali sinar hijau yang dapat dilihat dengan panjang gelombang 525 μm . Methanol 50% sebagai bahan fiksasi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Zona Pelusida

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 Keefer *et al.*, (1997) zona pelusida adalah lapisan glikoprotein yang membungkus oosit dan mengikat spermatozoa pada proses fertilisasi.

Perlekatan kepala spermatozoa ke zona pelusida tampaknya diatur oleh sisi reseptor (penerima) dipermukaan zona pelusida. Perlakuan ovum dengan antibodi antizona atau enzim tripsin menghambat perlekatan atau ikatan spermatozoa dengan zona pelusida. Ikatan tersebut juga dapat dihambat dengan pra-perlakuan dengan antibodi anti spermatozoa atau glikoprotein yang diekstraksi dari zona pelusida. Antibodi terhadap spermatozoa atau zona pelusida dapat menghambat atau menutupi sisi reseptor spermatozoa dan zona pelusida (Hafez, 1993).

Reseptor spermatozoa di zona pelusida telah diidentifikasi sebagai satu dari tiga glikoprotein utama yang membentuk matriks ekstraseluler zona pelusida. Ketiga glikoprotein yang dimaksud adalah ZP₁, ZP₂ dan ZP₃ yang disintesis dari oosit masak atau matang dan walaupun protein-protein tersebut bervariasi, tampak bahwa protein-protein tersebut terdapat pada semua spesies mamalia. Fungsi ZP₃ sebagai reseptor spermatozoa yang hanya mengandung akrosom utuh atau lengkap bisa berjalan. Ikatan spermatozoa dengan reseptor spermatozoa terjadi melalui interaksi dengan oligosakarida tertaut dengan *O-linked oligosakarida* pada ZP₃.

Adanya glikosil transferase, proteinase dan glikosid pada membran plasma yang menutupi atau menyelubungi kepala spermatozoa dapat menyebabkan ikatan dengan ZP₃ melalui mekanisme kunci dan anak kunci seperti enzim dan substratnya (Wassarman, 1990).

Penetrasi zona pelusida oleh spermatozoa terjadi dalam 5-15 menit setelah perlekatan spermatozoa. Reaksi akrosom bisa terjadi sebelum atau sesudah perlekatan kepala spermatozoa ke reseptor glikoprotein di zona pelusida, tetapi spermatozoa dengan akrosom utuh diperlukan untuk perlekatan. Ikatan kepala spermatozoa dengan ZP₃ menyebabkan interaksi dengan komponen zona lainnya yang menstimulasi aktivasi akrosom. Reaksi akrosom memungkinkan pelepasan lisin zona yang menyebabkan spermatozoa mencerna sebuah lintasan melalui zona pelusida ke membran viteline. Akrosom pada mamalia mengandung enzim seperti hyaluronidase, proakrosin (bentuk inaktif dari akrosin), esterase, fosfolifase A₂, asam fosfatase, aril sulfatase, B-N-asetil glukosaminidase, aril amidase dan asam proteinase non spesifik; tetapi, kualitas dan kuantitasnya berbeda-beda tergantung spesiesnya (Hafez, 1993).

Akrosin dianggap sebagai lisin zona esensial untuk penetrasi spermatozoa, tetapi jumlah enzim yang ada atau yang melekat pada membran akrosomal menunjukkan bahwa suatu kombinasi enzim bekerja sinergis selama penetrasi. Konsisten dengan struktur glikoprotein heterogen dari zona pelusida. Enzim yang terlibat selama reaksi akrosom dibutuhkan untuk perjalanan spermatozoa menuju zona pelusida, tetapi motilitas spermatozoa juga dibutuhkan (Yanagimachi, 1981). Karena spermatozoa yang bereaksi akrosomal mengawali penetrasi zona pelusida,

glikoprotein ZP₂ dapat bertindak sebagai reseptor spermatozoa sekunder untuk mempertahankan perlekatan spermatozoa selama menuju zona pelusida.

Zona pelusida kambing mempunyai ketebalan 0,014 (0,011-0,016) mm (Ismudiono, 1999). Zona pelusida mengandung tiga jenis glikoprotein yaitu ZP₁, ZP₂ dan ZP₃. Peranan penting dari glikoprotein zona pelusida dalam proses reproduksi adalah sebagai kandidat yang spesial untuk imunokontrasepsi (Gupta *et al.*, 1997). Glikoprotein zona pelusida mengandung sejumlah antigenik determinan termasuk karbohidrat, protein dan epitop yang imunogenitasnya bervariasi pada mamalia (Skinner *et al.*, 1999).

Zona pelusida merupakan barrier yang efektif terhadap mikroorganisme patogen. Diantara komponen glikoprotein zona pelusida, ZP₃ yang berperan penting dalam fertilisasi. Fungsi ZP₃ adalah sebagai reseptor pengenalan bagi spermatozoa, sedangkan ZP₂ sebagai reseptor spermatozoa yang kedua, untuk menjaga terikatnya spermatozoa selama proses penembusan zona pelusida saat fertilisasi, ZP₂ dan ZP₃ membentuk kerangka yang dihubungkan oleh ZP₁ menyilang membentuk struktur tiga dimensi (Neimann, 1993). Menurut Bleil dan Wassarman (1988) dikutip oleh Xin Zhang *et al.*, (1997) ZP₃ bertindak sebagai reseptor primer spermatozoa, dimana sebagian besar terdiri dari *O-Linked oligosacchariida*. 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*.

2.2. Spermatozoa

Spermatozoa terdiri dari bagian kepala, leher dan ekor yang berbeda susunan kimiawinya. Kepala terdiri dari *Deoksiribo nucleoprotein* (DNA) yang sebagian besar terdapat di dalam inti, yang bersenyawa dengan protein, sedangkan akrosomnya mengandung ikatan protein dan karbohidrat yang disebut akrosomal polisakarida. Pada bagian leher spermatozoa mengandung lipoprotein, sitokrom yang penting dalam reaksi pernafasan spermatozoa. Selubung mitokondria berasal dari pangkal kepala mengandung enzim yang berhubungan dengan eksudatif spermatozoa. Bagian ekor spermatozoa mengandung plasminogen, protein keratin yang ada dibenang-benang fibril dan kulit spermatozoa sebagai penggerak (Toelihere, 1981).

2.3. 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 mekul yang dapat menimbulkan respon imun humoral atau seluler. Pada umumnya imunogen adalah juga antigen meskipun tidak selalu demikian (Baratawidjaja, 1998).

Suatu bahan atau mekul untuk dapat bersifat imunogen, tergantung beberapa faktor, yaitu komposisi kimiawi, ukuran mekul, 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, 1998). 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 10.000 Dalton (Bellanti, 1993). Zona pelusida merupakan protein yang mempunyai sifat antigenik (Crichton, 1983) dan menurut Wood *et al.*, (1982) zona pelusida mempunyai sifat imunogenik.

2.4. Antibodi

Pada dasarnya antibodi merupakan gamma globulin yang disebut sebagai imunoglobulin (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 yang 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).

2.5. Respon Imun

Respon imun tubuh mencakup semua mekanisme fisiologis yang membantu tubuh untuk mengenal benda-benda asing pada dirinya, menetralkan,

menyisihkan atau memetabolisih 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).

2.6. 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, 1983).

Bahan yang dapat digolongkan sebagai antifertilitas dapat bekerja pada berbagai tempat dalam tubuh yakni pada poros hipotalamus, hipofisis 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 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).

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 spermatozoa yang menyebabkan terjadinya kehamilan. Sehingga kontrasepsi dapat diartikan sebagai pencegah terjadinya kehamilan sebagai akibat pertemuan sel telur dengan spermatozoa. Kontrasepsi dapat digunakan untuk menunda kehamilan, menjarangkan dan menghentikan kesuburan (Pabbadja, 1992). Untuk mencapai tujuan tersebut berbagai cara dilakukan, antara lain penggunaan obat per oral, suntikan atau implantasi subcutan, intravaginal; penggunaan alat dalam saluran reproduksi (kondom, alat kontrasepsi dalam rahim); operasi (Vasektomi, tubektomi); atau dengan obat topikal intra vaginal yang bersifat spermisid (Suherman, 1995).

2.8. Imunokontrasepsi

Imunokontrasepsi merupakan kontrasepsi yang diberikan secara suntikan 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 spermatozoa, antigen zona pelusida dan antigen humoral (Feng, 1999).

Prinsip dasar kontrasepsi adalah menggunakan mekanisme pertahanan imun tubuh untuk menghasilkan perlindungan terhadap kehamilan atau kebuntingan yang tidak direncanakan. Tujuan utama pengembangan imunisasi kontrasepsi adalah untuk membuat imunisasi aktif terhadap spermatozoa, 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, dapat menimbulkan antibodi untuk menghambat fungsi gamet (Naz *et al.*, 1995).

Pada dasarnya antigen zona pelusida dapat menimbulkan imunoglobulin (Ig) yang mampu memblokir pertautan spermatozoa dipermukaan zona pelusida (Crightton, 1983).

BAB III

MATERI DAN METODE

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu penelitian

Pengumpulan dan preparasi zona pelusida dari oosit kambing serta penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kebidanan Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Pengambilan spermatozoa kambing di kelurahan Mojo, Kecamatan Gubeng, Kota Surabaya. Penelitian ini mulai pada tanggal 25 Agustus 2002 sampai 20 Januari 2003. Proses sonikasi menggunakan alat *Ultrasonic Homogenizer* dan mikroskop fluoresen untuk pengamatan hasil penelitian dilakukan di *Tropical Disease Centre*, Universitas Airlangga, Surabaya.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing. *Phosphat Buffer Saline* (PBS) sebagai bahan sentrifus dan sonikasi spermatozoa serta sonikasi zona pelusida. Sebagai bahan pencuci menggunakan PBS yang mengandung *Bovine serum albumine* (BSA) 1% untuk menghilangkan antibodi yang tidak berikatan dengan reseptornya yaitu homogenat zona pelusida dan spermatozoa. Untuk fiksasi menggunakan methanol 50%. Antibodi primer (Ab_1) yaitu serum hasil imunisasi zona pelusida 3 (ZP₃) kambing pada mencit. Antibodi sekunder (Ab_2) yaitu antibodi anti

imunoglobulin G (Ig G) mencit yang dilebel *fluorescein isothiocyanate* (FITC) sebagai pembantu atau pendamping dilihat dengan mikroskop fluoresen.

Complete freunds Adjuvant dan *Incomplete Freunds adjuvant* untuk mempertahankan dan meningkatkan titer antibodi. NaCl fisiologis untuk mencuci ovarium.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Vagina Buatan untuk mengambil spermatozoa kambing, pipet untuk membuang cairan hasil sentrifus yang mengandung plasma spermaozoa. Inkubator untuk mengeringkan preparat ulas. Mikropipet untuk mengambil dan mengencerkan cairan fluorensen dengan PBS. Sentrifus dan tabung sentrifus untuk mensentrifugasi spermatozoa dengan putaran 3000 rpm selama tujuh menit. *Ultrasonic Homogenizer* dengan probe berukuran 2 mm yang digunakan untuk menghancurkan zona pelusida dan spermatozoa menjadi partikel yang lebih kecil. Gelas obyek sebagai preparat ulas dan mikroskop fluoresen dengan pembesaran 400 kali untuk melihat ikatan zona pelusida dengan sperematozoa kambing. Tuberculine syringe 1ml untuk melepas zona pelusida dari oosit. Cawan petri sebagai tempat oosit yang akan dipecah. Vial sebagai tempat zona pelusida. Mikroskop *disecting* (Meiji, Japan) untuk melihat dan menghitung jumlah oosit dan jumlah zona pelusida. Spuit 5 ml dengan jarum 18 G untuk aspirasi cairan folikel dari ovarium. Pipet mikro haematokrit untuk mengambil darah dari sudut mata luar mencit.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Persiapan

Kambing jantan untuk diambil semen terlebih dahulu dikandang terpisah guna mendapatkan semen yang konsentrasi spermatozoa yang optimal.

3.3.2. Pengambilan Semen Kambing

Tiga hari sebelum pengambilan semen; kambing jantan terlebih dahulu dikandang terpisah dengan kambing betina birahi, selanjutnya kambing jantan dilepas ke kandang betina birahi untuk melakukan kopulasi. Pada saat kambing jantan mengawini betina birahi arahkan vagina buatan pada alat kelaim jantan (penisnya). Semen yang tertampung dalam tabung sentrifus yang berisi *Phosphat Buffer Saline* (PBS) disentrifus tiga kali dengan putaran 3000 rpm selama tujuh menit. Tujuan dilakukannya sentrifus adalah guna mendapatkan spermatozoa tanpa adanya plasma semen. Hasil sentrifus disimpan dalam refrigerator sampai dengan waktunya digunakan.

3.3.3. Preparasi Zona Pelusida

Ovarium kambing diperoleh dari RPH Pegirian Surabaya, dimasukkan dalam termos yang berisi NaCl fisiologis dan dibawa ke Laboratorium Kebidanan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Selanjutnya dilakukan aspirasi cairan folikel dengan spuit 5 ml dengan jarum 18 G yang telah berisi cairan PBS. Aspirasi oosit dikerjakan dengan melakukan penusukan dari beberapa folikel pada satu ovarium dan diganti ovarium berikutnya, selanjutnya

cairan folikel ditampung pada tabung koleksi. Cairan tabung koleksi dituangkan ke cawan petri dan ditempatkan pada lapang pandang mikroskop *disecting*.

Zona pelusida dipisahkan dengan cara memecah oosit untuk dikeluarkan isinya pada mikroskop *disecting*, dengan melakukan penusukan corona radiata dan membran vitelin dengan menggunakan tuberculin syringe 1 ml. Zona pelusida yang diperoleh tersebut telah bebas dari kumulus maupun vitelus dikoleksi dalam tabung Eppendorf sampai jumlahnya terpenuhi.

Zona pelusida yang terkumpul dicuci tiga kali dengan sentrifus 7000 rpm selama 10 menit. Pelet (*pellet*) zona pelusida yang diperoleh dimasukkan pada vial plastik, selanjutnya dilakukan sonikasi menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* tegangan 25 KHz agar pecah menjadi partikel yang lebih kecil.

3.3.4. Pembuatan Antibodi anti Zona Pelusida

Antibodi anti zona pelusida dibuat dengan cara melakukan imunisasi pada mencit betina dengan 100 μ l suspensi yang mengandung 40 μ g ZP₃ kambing dalam *Complete Freund Adjuvant* (CFA) dengan perbandingan 1 : 1. Penyuntikan *booster* dilakukan dua kali dengan interval sebelas hari dengan dosis sama dalam *Incomplete Freund Adjuvant* (IFA) dalam perbandingan 1 : 1.

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

sentrifugasi darah dalam tabung Eppendorf dengan kecepatan 4000 rpm selama 15 menit, sehingga terbentuk dua lapisan. Supernatan yang terjadi merupakan serum, dipisahkan dengan cara menghisap dengan pipet pelan-pelan, sedangkan endapan berupa eritrosit dibuang. Serum yang mengandung antibodi anti zona pelusida tersebut disimpan beku dalam refrigerator sampai dengan waktunya digunakan (Mulyati, 2001).

3.4. Fluoresen Antibodi Teknik (FAT)

3.4.1. Direck FAT

Uji ini digunakan untuk mengetahui adanya antigen. Antibodi yang ditunjukkan terhadap suatu antigen khusus seperti bakteri atau virus dapat diberi label dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Sayatan jaringan atau preparat ulas yang mengandung organisme ini dapat diaramkan dengan antiserum berlabel lalu dicuci untuk membuang antibodi yang tidak terikat. Bila diperiksa dengan cahaya lapangan gelap dengan mikroskop yang dilengkapi dengan sinar ultraviolet, partikel antigen yang telah mengikat antibodi berlabel terlihat berpendar terang (Tizard, 1988).

3.4.2. Indireck FAT

Uji antibodi fluoresen tidak langsung dapat digunakan untuk menemukan dan mengukur antibodi dalam serum atau untuk mendemonstrasi dan pengenalan antigen pada jaringan atau biak sel. Bila untuk pengujian antibodi, antigen yang digunakan seperti ulasan jaringan, sayatan atau biak sel. Antigen yang diaramkan

dengan serum yang diduga mengandung antibodi terhadap antigen tadi, lalu serum dihilangkan dengan pencucian, meninggalkan antibodi yang terikat dengan antigen. Antibodi yang terikat ini dapat dilihat dengan mengeramkan preparat dengan serum antiglobulin (serum yang mengandung antigen) berlabel FITC. Bila zat ini dihilangkan dengan pencucian dan preparat diperiksa, fluoresensi menunjukkan bahwa antibodi terdapat dalam serum yang diuji (Tizard, 1988).

Untuk mengetahui reseptor antibodi primer (Ab_1 / antibodi hasil imunisasi zona pelusida 3 (ZP_3) kambing pada mencit) pada homogenat zona pelusida kambing, maka digunakan uji indireck FAT.

3.5. Metode Pembuatan Preparat

Pembuatan preparat untuk pemeriksaan adanya ikatan homogenat zona pelusida dengan antibodinya dan homogenat zona pelusida dengan spermatozoa dilakukan sebagaimana diringkas dalam tabel.

Tabel 1. Ringkasan Metode Pembuatan Preparat Imunofluoresen

Gelas Obyek	Spz	H-ZP	Ab_1	Ab_2
I	-	+	+	+
II	+	-	+	+
III	+	+	+	+

Keterangan :

- Spz : Spermatozoa kambing
- H-Zp : Homogenat zona pelusida kambing
- Ab_1 : Antibodi primer, antibodi hasil imunisasi mencit dengan *goat ZP₃*
- Ab_2 : Antibodi sekunder, antibodi anti imunoglobulin G mencit

3.5.1. Gelas Obyek I

Homogenat zona pelusida kambing dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) yang mengandung *Bovine Serum Albumine* (BSA) 1% selama 15 menit. Reaksikan dengan antibodi primer (Ab_1) yaitu serum hasil imunisasi *goat ZP_3* pada mencit, inkubasikan pada inkubator dengan suhu $37^{\circ}C$ selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Reaksikan dengan antibodi sekunder (Ab_2) yaitu antibodi anti immunoglobulin G mencit yang dilabel *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Preparat tersebut diperiksa dengan mikroskop fluoresen 400 kali.

3.5.2. Gelas Obyek II

Spermatozoa kambing dibuat preparat ulas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1% selama 15 menit. Reaksikan dengan antibodi primer (Ab_1), inkubasikan pada inkubator dengan suhu $37^{\circ}C$ selama 45 – 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Reaksikan dengan antibodi sekunder (Ab_2). Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Preparat tersebut diperiksa dengan mikroskop fluoresen 400 kali.

3.5.3. Gelas Obyek III

Spermatozoa kambing dibuat prepatas pada gelas obyek dan biarkan beberapa saat sampai mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan PBS yang mengandung BSA 1% selama 15 menit. Teteskan homogenat zona pelusida diatas preparat ulas dan ratakan. Reaksikan dengan antibodi primer (Ab_1) dan diinkubasikan pada inkubator dengan suhu $37^{\circ}C$ selama 45 - 60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Reaksikan dengan antibodi sekunder (Ab_2) yang dilabel FITC. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Periksa dengan mikroskop fluoresen 400 kali.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

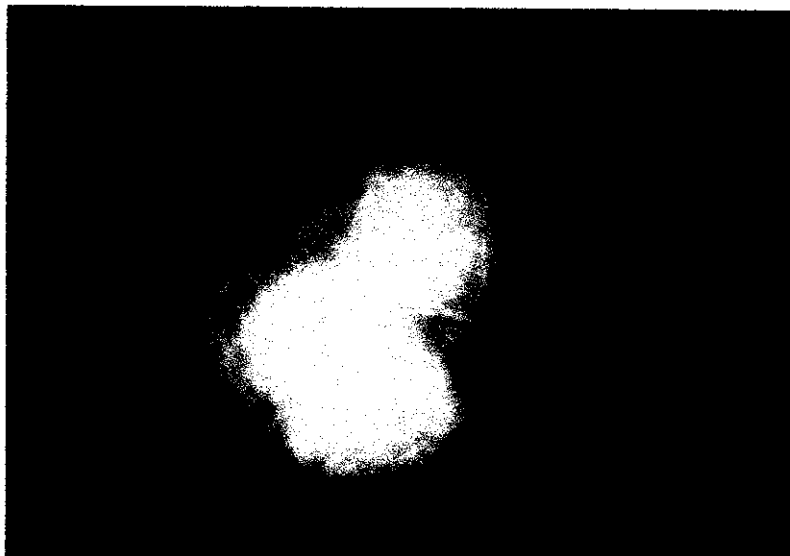
BAB IV

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian pada gelas obyek 1, 2 dan 3 dilihat dengan mikroskop fluoresen dengan pembesaran 400 kali tampak sebagaimana gambar 1, 2 dan 3.

4.1. Gelas Obyek I

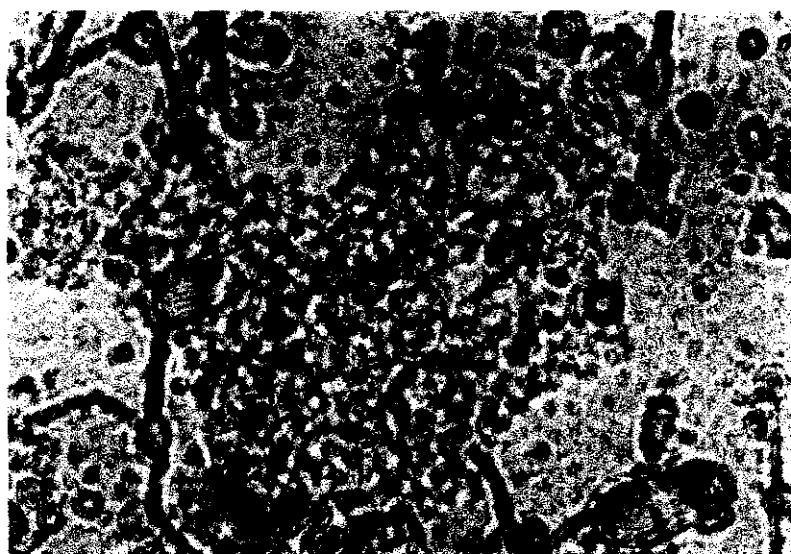
Hasil pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop fluoresen, preparat ulas homogenat zona pelusida (ZP) kambing yang ditambahkan antibodi primer (Ab_1) yaitu serum hasil imunisasi *goat* ZP₃ pada mencit, kemudian ditambahkan dengan antibodi sekunder (Ab_2) yaitu antibodi anti imunoglobulin G mencit yang dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Menghasilkan gambaran homogenat zona pelusida yang berfluoresensi, (Gambar 1).



Gambar 1. Homogenat zona pelusida yang berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.

4.2. Gelas Obyek II

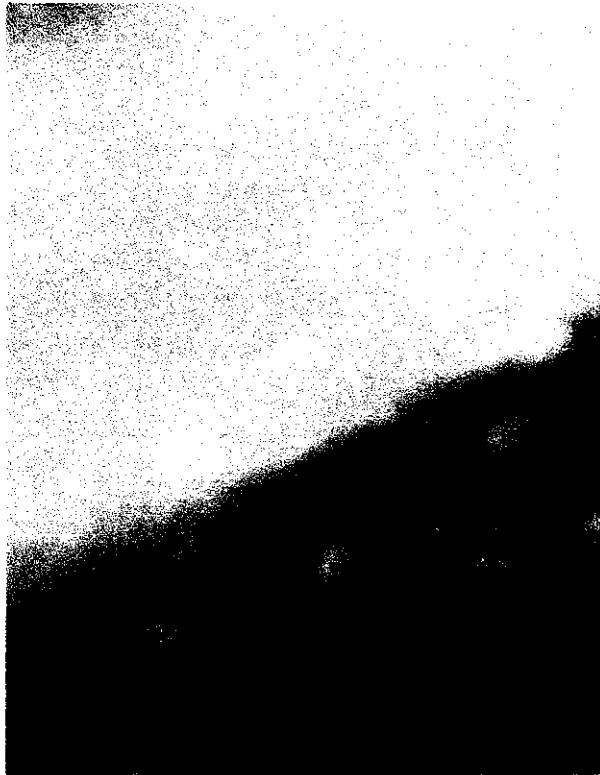
Pemeriksaan preparat ulas spermatozoa kambing yang ditambahkan dengan antibodi primer (Ab_1) yaitu serum hasil imunisasi *goat ZP₃* pada mencit, kemudian ditambahkan antibodi sekunder (Ab_2) yaitu antibodi anti imunoglobulin G mencit yang dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC), ternyata tidak menghasilkan gambaran spermatozoa yang berfluoresensi, (Gambar 2).



Gambar 2. Spermatozoa yang tidak berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.

4.3. Gelas Obyek III

Pada pemeriksaan preparat ulas spermatozoa kambing ditambahkan homogenat zona pelusida kambing, ditambahkan antibodi primer (Ab_1), kemudian ditambahkan antibodi sekunder (Ab_2) yang dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Menghasilkan gambaran spermatozoa berfluoresensi, terutama dibagian kepala spermatozoa, (Gambar 3).



Gambar 3. Spermatozoa yang berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen pembesaran 400 kali.

BAB V

PEMBAHASAN

BAB V

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian pada gelas obyek I (pertama), dapat diketahui bahwa penggunaan antibodi primer (Ab_1) yang berasal dari hasil imunisasi *goat* ZP_3 pada mencit mampu berikatan dengan homogenat zona pelusida yang berasal dari oosit kambing. Antibodi primer tersebut adalah terhadap zona pelusida kambing. Selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang berasal dari antibodi anti imunoglobulin G mencit yang telah dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Sehingga dengan mikroskop fluoresen tampak gambaran zona pelusida berfluoresensi, (Gambar 1).

Pada kontrol positif tersebut (gelas obyek pertama) antibodi primer (Ab_1) pada penelitian ini adalah serum hasil imunisasi mencit dengan ZP_3 kambing (Mulyati *et al*, 2001). Pemaparan serum tersebut pada homogenat zona pelusida menyebabkan antibodi primer (Ab_1) dapat melekat pada antigennya yaitu homogenat zona pelusida. Adanya perlekatan antibodi primer dengan homogenat zona pelusida tersebut dapat diketahui dengan adanya fluoresensi pada gelas obyek pertama.

Pada gelas obyek II, Antibodi primer (Ab_1 / serum hasil imunisasi *goat* ZP_3 pada mencit) tidak dapat berikatan dengan spermatozoa kambing dan antibodi sekunder (Ab_2 / antibodi anti imunoglobulin G mencit yang dilabel FITC). Preparat ini sebagai kontrol negatif karena tanpa homogenat zona pelusida reseptor yang dimiliki spermatozoa tidak dapat berikatan dengan antibodi primer

(Ab₁) dan antibodi sekunder (Ab₂), sehingga tidak terjadi ikatan (binding), kejadian ini tampak dengan mikroskop fluoresen gambaran spermatozoa tidak berfluoresensi, (Gambar 2).

Kontrol negatif (gelas obyek kedua), spermatozoa tanpa homogenat zona pelusida, antibodi primer tidak dapat terikat pada spermatozoa. *Egg binding protein* pada spermatozoa dapat berikatan dengan reseptornya pada ZP₃ dipermukaan zona pelusida (Hafez, 1993). Tidak adanya homogenat zona pelusida menyebabkan antibodi primer (Ab₁) yang ditambahkan tidak dapat melekat pada membran plasma spermatozoa. Tanpa adanya antibodi primer (Ab₁) yang melekat maka tidak ada antibodi sekunder (Ab₂) yang melekat, sehingga tidak terjadi fluoresensi pada gelas obyek kedua.

Pada gelas obyek III (tiga), antibodi primer (Ab₁) mampu berikatan dengan homogenat zona pelusida kambing (spesies yang sama), selanjutnya homogenat zona pelusida kambing berikatan dengan spermatozoa kambing kemudian berikatan dengan antibodi sekunder (Ab₂) yang dilabel dengan *fluorescein isothiocyanate* (FITC). Sehingga pada preparat ini terlihat dengan mikroskop fluoresen gambaran spermatozoa yang berfluoresensi. Pada preparat ini membuktikan bahwa antibodi primer (Ab₁) yang berasal dari hasil imunisasi *goat* ZP₃ pada mencit mampu berikatan dengan homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing sehingga terjadi pengikatan dan perlekatan.

Pada gelas obyek ketiga tersebut homogenat zona pelusida yang ditambahkan pada sediaan ulas spermatozoa akan melekat pada membran plasma spermatozoa seperti pada fertilisasi. Sebagaimana gelas obyek pertama,

keberadaan homogenat zona pelusida yang melekat pada spermatozoa dapat diketahui dari ikatannya dengan antibodi primer (Ab_1). Antibodi primer (Ab_1) dapat berikatan dengan antibodi sekunder (Ab_2), sehingga pada gelas obyek ketiga kepala spermatozoa berfluoresensi.

Imunokontrasepsi mempunyai mekanisme kerja yaitu menutup reseptor sesuai antigen yang diinjeksikan (Aitken *et al.*, 1996). Zona pelusida (ZP_3) kambing yang diinjeksikan pada mencit betina akan merangsang terbentuknya respon imun dalam tubuh yang akan merangsang timbulnya antibodi spesifik.

Antigen zona pelusida (Ag-ZP) setelah disuntikan akan menimbulkan anti Ag-ZP yang dicerminkan sebagai Ig G spesifik (Wood *et al.*, 1981). Penyuntikan zona pelusida akan menghasilkan imunoglobulin terutama Ig A dan Ig G (Jackson *et al.*, 1998), dimana Ig A dan Ig G terdapat pada *tractus genitalis* betina dan hasil sekresinya. Pada dasarnya antigen zona pelusida yang menimbulkan Ig G spesifik mampu menghambat pertautan spermatozoa di permukaan zona dan mengadakan pengerasan zona (Crightton, 1983). Antibodi zona pelusida dalam sirkulasi mungkin mempunyai peranan penting pada antifertilitas. Hal ini 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 menutup tempat pengikatan spermatozoa sehingga fertilisasi tidak terjadi (Mulyati *et al.*, 2001 ;

Yuniarti, 2002). Penelitian ini membenarkan dugaan tersebut karena ternyata antibodi primer dapat terikat pada zona pelusida.

Suspensi zona pelusida merupakan kontrasepsi yang langsung bekerja pada gamet sehingga tidak mengganggu kerja endokrin (Castle *and* Dean, 1996). Imunokontrasepsi menggunakan zona pelusida tidak menimbulkan perubahan pada siklus hormonal dan perkembangan folikel (Wood *et al.*, 1982).

Studi-studi yang menggunakan beberapa hewan model telah mendemonstrasikan bahwa imunisasi aktif dengan glikoprotein zona pelusida pada subyek betina dapat menimbulkan hambatan fertilitas (Bagawan *et al.*, 1984).

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

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang penggunaan antibodi zona pelusida maka dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Antibodi zona pelusida mampu berikatan dengan homogenat zona pelusida dengan adanya warna homogenat zona pelusida berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen.
2. Homogenat zona pelusida dapat berikatan dengan spermatozoa kambing dengan adanya warna spermatozoa berfluoresensi dilihat dengan mikroskop fluoresen.

6.2. Saran

Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka melalui penelitian ini dapat disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang identifikasi reaksi protein reseptor pada zona pelusida dan spermatozoa pada hewan antar spesies.

RINGKASAN

IDIL LAR. Identifikasi Reaksi Protein Reseptor pada Zona Pelusida dan Spermatozoa Kambing dengan Teknik Imunofluoresen dibawah bimbingan Sri Mulyati, M.Kes., drh. sebagai pembimbing pertama dan Tjuk Imam Restiadi, M.Si., drh. sebagai pembimbing kedua.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui terjadinya ikatan antara zona pelusida dengan antibodnya dan antara homogenat zona pelusida dan spermatozoa kambing.

Penelitian ini menggunakan spermatozoa, homogenat zona pelusida, zona pelusida 3 (ZP₃) kambing hasil imunisasi pada mencit (Ab₁) dan antibodi anti imunoglobulin G mencit yang dilabel *fluorescein isothiocyanate*: FITC (Ab₂). Sebagai bahan fiksasi menggunakan methanol 50% selama 15 menit dan dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) yang mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) 1% selama 15 menit. Penelitian ini terdiri atas tiga gelas obyek.

Gelas obyek I : Homogenat zona pelusida dibuat ulas dan biarkan mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Tambahkan Ab₁ dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 45-60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Tambahkan Ab₂. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Periksa dengan mikroskop fluorezen 400 kali. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya gambaran homogenat zona pelusida berfluoresensi. Preparat ini sebagai

kontrol positif karena antibodi primer mampu mengikat homogenat zona pelusida dan antibodi sekunder.

Gelas obyek II : Spermatozoa dibuat ulas dan biarkan mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Tambahkan Ab_1 dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 45-60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Tambahkan Ab_2 . Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Periksa dengan mikroskop fluoresen 400 kali. Hasil pemeriksaan menunjukkan tidak adanya gambaran spermatozoa yang berfluoresensi. Preparat ini sebagai kontrol negatif karena reseptor yang dimiliki antibodi primer (Ab_1) tidak sesuai dengan spermatozoa.

Gelas obyek III : Spermatozoa dibuat ulas dan biarkan mengering. Fiksasi dengan methanol 50% selama 15 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Teteskan homogenat zona pelusida. Tambahkan Ab_1 , inkubasi pada inkubator suhu 37 °C selama 45-60 menit. Cuci dengan PBS + BSA 1%. Tambahkan Ab_2 . Cuci dengan PBS + BSA 1% selama 15 menit. Periksa dengan mikroskop fluouresen 400 kali. Hasil pemeriksaan menunjukkan adanya gambaran spermatozoa berikatan dengan zona pelusida yang berfluoresensi.

Hasil dari serangkaian gelas obyek dapat disimpulkan bahwa antibodi zona pelusida 3 (ZP_3) kambing dapat berikatan dengan homogenat zona pelusida, sedangkan homogenat zona pelusida dapat berikatan dengan spermatozoa kambing.

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.6-24.
- Baratawidjaja, K.G. 1998. *Imunologi Dasar*. Edisi ketiga. Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta.16-25.
- Bellanti, J.A. 1993. *Imunologi III*. Edisi bahasa Indonesia. Gajah 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., J.I., Sandlow, A.E., Sparks, A. Sandra. 1999. Development of Immunocontraception Vaccine. Current Status. *J Reprod. Med.* 44(9): 756-65.
- 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.
- Hafez, E.S.E. 1993. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Lea and Febiger. Philadelphia. 191-192
- Hamamah, S., D. Royere, M. Jean, H. Lucas. 1997. The future of Male Contraception by Preventing Gamete Interaction. *Hum. Reprod.* 25(2): 135-90.
- Hasegawa, A., Y. Hamada, M. Shigeta and K. Koyama. 2001. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein. *J Reprod immunol.* 53 (2002): 91-98.
- Hasegawa, A., K. Koyama and S. Isojima. 1991. Isolation of Sour Mayor 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. 89-90.
- Jackson, R.J., J.M., Deborah, A.H., Lyn, and A. Ramshaw. 1998. Infertility In Mice Induced Rekombinant Ectomelia Virus Expressing Mouse Zona pellucida Glycoprotein. *Biology of Reprod.* 58 : 152-159.
- Keefe, D., P. Tran, C. Pelegrini, R. Aldenborough. 1997. Polarized Light Microscopy and Digital Image Processing Identify a Multilaminar Structure of the hamster Zona Pellucida. *Hum. Reprod.* 12(6): 1250.
- Kiefer, S.M. and P. Saling. 2002. Proteolytic processing of human zona pellucida proteins. *Biology of Reproduktion* 66: 407-414.
- Lee, E.B. and H.C. Chi. 1985. Female Antifertility of Natural Products. In Proceeding from the UNESCO Regional Workshop. 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.
- Mulyati, S., I. Mustafa dan S. Utama. 2001. Uji Potensi Zona Pelusida fraksi 3 (ZP3) kambing sebagai Bahan Antifertilisasi. Laporan Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya. 19-25.
- 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.
- Pabbadja, S. 1992. Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera untuk Kader. Departemen kesehatan RI. Jakarta.
- Sartono. 1996. Apa yang Sebaiknya Anda Ketahui tentang Obat Wajib Apotik, Edisi kedua. 4-14.
- Srivastava, N., R. Santhanam, P. Sheela, S. Mukund, S. S. Thakral, B. S. Malik and S. K. Gupta. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli*-expressed recombinant Dog ZP2 and ZP3 in a Homologous Animal Model. *Reprod.* 123 (2002): 847-857.

- Skinner, S.M., E.S. Schwoebel., S.V. Prasad., M. Oguna., B.S. Dumbar 1999. Mapping of Dominant B-Cell Epitopes of A Human Zona pellucida Protein (ZP1). *Biol. Reprod. Dec*; 61(6): 1373-80.
- Talevi, R., R. Gualteri, G. Tartaglioine, 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. 25-45 & 132-134.
- Toelihere, M.R. 1981. *Fisiologi Reproduksi pada Ternak*. Penerbit Angkasa. Bandung. 108-112
- 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. Seminar. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya. 24-27.
- Zulfah. 2001. Pengaruh Penyuntikan suspensi Oosit Immatur Kambing sebagai Antifertilitas terhadap Biometri Alat Reproduksi Mencit (*Mus musculus*) Betina. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.