

11 NOV 2005

SELESAI
PAMERAN



LAPORAN PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2003

**UJI POTENSI KONTRASEPTIF BAHAN BIOAKTIF ANTIBODI
ANTI ZONA PELUSIDA – 3 KAMBING (gZP3)
PADA FERTILISASI IN VITRO**

Oleh:

drh. Sri Mulyati, M.Kes.
drh. Imam Mustofa, M.Kes.
drh. Tjuk Imam Restiadi, M.Si.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi

DIP Nomor : 005/XXIII/1/--/2003 Tanggal 1 Januari 2003

Kontrak Nomor : 21/P2IPT/DPPM/PID/III/2003

Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut 7

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2003

- REPRODUCTIVE TECHNOLOGY
PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
- CONTRACEPTION, IMMUNOLOGICAL



LAPORAN PENELITIAN DASAR
TAHUN ANGGARAN 2003

KK
KKC
613.94
Mul
U

**UJI POTENSI KONTRASEPTIF BAHAN BIOAKTIF ANTIBODI
ANTI ZONA PELUSIDA – 3 KAMBING (gZP3)
PADA FERTILISASI IN VITRO**

Oleh:

drh. Sri Mulyati, M.Kes.
drh. Imam Mustofa, M.Kes.
drh. Tjuk Imam Restiadi, M.Si.



* 0 1 0 3 0 4 1 4 1 *



010304141

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
DIP Nomor : 005/XXIII/1/--/2003 Tanggal 1 Januari 2003
Kontrak Nomor : 21/P2IPT/DPPM/PID/III/2003
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas
Nomor Urut 7

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2003

**LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DASAR**

1. Judul Penelitian	: Uji Potensi Kontraseptif Bahan Bioaktif Antibodi Antizona Pelusida-3 Kambing (gZP3) Pada Fertilisasi <i>In Vitro</i>
2. Ketua Peneliti	
a. Nama Lengkap dan Gelar	: Sri Mulyati, M.Kes., drh.
b. Jenis Kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan/NIP	: Penata/III-C/131 760 379
d. Jabatan Fungsional	: Lektor
e. Fakultas	: Kedokteran Hewan
f. Universitas	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang Diteliti	: Biologi Reproduksi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 3 (tiga) Orang
4. Lokasi Penelitian	: Laboratorium Kebidanan & Tropical Disease Centre
5. Kerjasama dengan Institusi Lain	: ----
6. Masa Penelitian	: 5 (Lima) Bulan
7. Biaya yang Diperlukan	: Rp. 15.000.000,- (Lima Belas Juta Rupiah)

Mengesahkan :
Dekan Fakultas Hewan



Prof. Dr. Ismudiono, M.S., drh.
NIP. 130 687 297



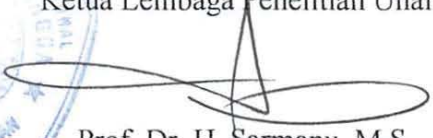
Surabaya, 15 September 2003

Ketua Peneliti,



Sri Mulyati, M.Kes., drh.
NIP. 131 760 379

Menyetujui :
Ketua Lembaga Penelitian Unair,



Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.
NIP. 130 701 125



RINGKASAN

**Uji Potensi Kontraseptif Bahan Bioaktif Antibodi
Antizona Pelusida-3 Kambing (gZP3) Pada Fertilisasi *In Vitro***

(Sri Mulyati, Imam Mustofa, Tjuk Imam Restiadi 2003, 47 Halaman)

Penelitian tentang vaksin kontrasepsi dilakukan dalam rangka menutup efek samping yang terjadi pada penggunaan metode kontrasepsi konvensional. Pada beberapa penelitian imunisasi hewan coba dengan sediaan zona pelusida murni dapat secara efektif menekan fertilitas. Penelitian sebelumnya di laboratorium kami menunjukkan bahwa imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan 40 µg zona pelusida 3 kambing (*goat zona pellucida 3*, gZP3) menghasilkan kegagalan kebuntingan pada seluruh hewan coba. Hal ini diduga karena antibodi gZP3, sebagai respon imun terhadap glycoprotein gZP3 menyebabkan hambatan pengeblokan interaksi sel spermatozoa dengan oosit.

Zona pelusida merupakan lapisan matrik glycoprotein yang menyelimuti sel telur. Zona pelusida kambing mempunyai ketebalan $16,80 \pm 0,62$ µm, membentang menyelimuti sel telur dengan diameter $174,74 \pm 8,41$ µm. Identifikasi gZP3 dengan *Sodium dodecyl sulphate – poly acrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) menemukan bahwa massa molekul relatif (Mr) gZP3 sekitar 80 kDa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peranan antibodi gZP3 yang disuplementasikan kedalam medium maturasi oosit dan antigen glycoprotein gZP3 yang disuplementasikan kedalam media kapasitasi spermatozoa terhadap terjadinya fertilisasi *in vitro* berdasarkan terbentuknya embrio stadium *cleavage*.

Antibodi anti gZP3 dibuat dengan cara imunisasi mencit (*Mus musculus*) betina dengan 0,1 µl suspensi yang mengandung 40 µg gZP3 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) (1 : 1). Pengambilan darah untuk penentuan titer antibodi dengan teknik Elisa, dilakukan pada hari ketujuh setelah penyuntikan *booster* yang terakhir.

Sampel penelitian ini adalah 120 buah kompleks oosit kumulus sapi dibagi secara acak menjadi tiga kelompok. Kelompok kontrol, maturasi oosit menggunakan media *Tissue Culture Medium – 199* (TCM-199) dengan suplemen *foetal calf serum* (FCS) dan kapasitasi spermatozoa menggunakan media *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS).

Kelompok kedua, maturasi oosit menggunakan media TCM-199 dengan suplemen 10 % serum mencit yang diimunisasi dengan 40 μ g gZP3 ; dan kapasitasi spermatozoa dilakukan seperti pada kelompok kontrol. Kelompok ketiga maturasi oosit dilakukan seperti pada kelompok kontrol namun pada media kapasitasi spermatozoa ditambahkan 10 % glycoprotein gZP3 sebagai antigen. Angka *cleavage* diperiksa 48 jam setelah fertilisasi *in vitro*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa titer antibodi pada mencit yang diimunisasi dengan 40 μ g gZP3 menghasilkan angka *optical density* yang lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol. Penambahan 10 % serum dari mencit (*Mus musculus*) yang mengandung antibodi gZP3 menghasilkan angka *cleavage* sebesar 45,55 % (41/90) lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol yaitu sebesar 60 % (12/20). Penambahan gZP3 10 % dalam media kapasitasi spermatozoa sapi menghasilkan angka *cleavage* hanya sebesar 7,69 % (1/13) jauh lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan angka *cleavage* kelompok kontrol.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa antibodi gZP3 maupun antigen gZP3 dapat menurunkan angka *cleavage* pada fertilisasi *in vitro* sapi.

(Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya. Kontrak Nomor :
21/P2IPT/DPPM/PID/III/2003 Ditjen Dikti, Depdiknas).

SUMMARY

The Examination of Contraceptive Potential of Anti Goat Zona Pellucida 3 (gZP3) Antibody on In Vitro Fertilization

(Sri Mulyati, Imam Mustofa, Tjuk Imam Restiadi 2003, 47 Pages)

The researches of the contraceptive vaccine have been doing to overcome the side effects of conventional contraceptive method. Several studies, immunization with purified zona pellucida antigen has been shown to suppress fertility very effectively. The finding before in our laboratory define that immunization of mice (*Mus musculus*) using 40 µg fraction 3 of goat zona pellucida (gZP3) result of zero pregnancy. It was estimated that antibody directed against gZP3 glycoprotein cause infertility by an antibody mediated disruption of sperm – egg interaction.

Goat zona pellucida surround egg cell with $174,74 \pm 8,41$ µm diameter and $16,80 \pm 0,62$ µm thickness. Identification using Sodium dodecyl sulphate – poly acrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the relative molecular mass (Mr) of gZP3 is nearly 80 kDa.

The aim of the study was to demonstrate the role of anti gZP3 antibody of mice serum immunized with gZP3 antigen supplemented in medium of oocyte maturation and gZP3 antigen supplemented in sperm capacitation medium on successfully of cattle in vitro fertilization based on the formation of cleavage.

Anti gZP3 antibody produced of mice (*Mus musculus*) immunized with 40 µg of fraction 3 of goat zona pellucida. Each of eight mice injected three times, once as the first immunization and twice as booster in 11 days interval respectively. The first immunization, gZP3 suspension was diluted with Complete Freund's Adjuvant (CFA), meanwhile the booster gZP3 suspension was diluted Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1:1. Seven days after the last injection, the mice bleed to took serum for antibody measurement using Elisa technique.

The sample of this research were 120 cumulus oocyte complex (COC) of cattle divided randomly into three groups. The first, control group COC matured in Tissue Culture Medium – 199 (TCM-199) supplemented with foetal calf serum (FCS), meanwhile the capacitation of bull sperm using Earle's Balanced Salt Solution (EBSS).

The second group COC matured in TCM-199 supplemented with 10 % serum of mice immunized with 40 µg gZP3 ; and sperm capacitation take care like the control group. The third group, COC matured like in the control group but supplemented with 10 % glycoprotein gZP3. The cleavage harvested following 48 hours of in vitro fertilization.

The result show that immunization of mice using 40 µg gZP3 in Freund adjuvant with twice booster indicated increasing ($p < 0,05$) of optical density compared to the control group. The supplementation of 10 % mice serum immunized with 40 µg in medium of oocyte maturation indicated the lower cleavage rate (45,55 %, 41/90) compared to control group (60 %, 12/60). Meanwhile, supplementation of 10 % gZP3 antigen in capacitation medium showed cleavage rate only 7.69 % (1/13) ($p < 0,05$).

The conclusion of this research indicated that anti gZP3 antibody and gZP3 antigen decreased cleavage rate of cattle in vitro fertilization.

Research Institution of Airlangga University, Surabaya.
Funding by the Project of Basic Research
Contract Number : 21/P2IPT/DPPM/PID/III/2003
Directorate General of Higher Education, Department of National Education

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT., bahwa atas rahmat, taufik dan hidayahNya maka penelitian sampai dengan penyusunan laporan ini dapat dilaksanakan.

Penelitian ini dilakukan dalam rangka mencari alternatif tentang masalah kontrasepsi konvensional yang sudah dipakai selama ini dan banyak menimbulkan keluhan bagi pemakainya. Penelitian ini mencoba mengalihkan pemakaian kontrasepsi konvensional tersebut kepada imunokontrasepsi yang diharapkan langsung bekerja pada target organ sehingga tidak mempunyai efek samping bagi pemakainya. Dengan penerapan hasil penelitian ini diharapkan gZP3 yang berasal dari ovarium kambing yang diambil dari Rumah Potong Hewan di Surabaya dapat diproduksi menjadi salah satu imunokontrasepsi alternatif.

Pada kesempatan ini disampaikan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga, atas kepercayaannya mengabulkan proposal penelitian ini untuk dilaksanakan.
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, atas kelancaran mulai proses pengajuan proposal sampai dengan pelaporan akhir hasil penelitian ini.
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.
4. Kepala Laboratorium Kebidanan Veteriner FKH Unair beserta seluruh stafnya.
5. Pihak-pihak lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Sebagai hasil karya manusia, disadari sepenuhnya adanya beberapa kekurangan di beberapa bagian laporan ini. Saran dan kritik yang bersifat membangun sangat diharapkan baik untuk kematangan peneliti maupun agar laporan penelitian ini dapat memberi manfaat kepada pihak-pihak yang berkepentingan.

Surabaya, 15 September 2003

Peneliti



DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Perumusan Masalah	5
1.3. Hipotesis Penelitian.	6
1.4. Definisi Operasional	6
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	 8
2.1. Kontrasepsi	8
2.1.1. Kontrasepsi Konvensional	8
2.1.2. Immunokontrasepsi	9
2.2. Zona Pelusida	12
2.2.1. Fungsi Fisiologis	12
2.2.2. Mekanisme Immunokontraseptif pada Zona Pelusida ..	16
2.3. Fertilisasi <i>In Vitro</i>	17
2.3.1. Maturasi Oosit	18
2.3.2. Preparasi Sel Spermatozoa	18
2.3.3. Inseminasi <i>In Vitro</i>	19

BAB 3	TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	20
3.1.	Tujuan Penelitian	20
3.1.1.	Tujuan Umum	20
3.1.2.	Tujuan Khusus	20
3.2.	Manfaat Penelitian	21
3.2.1.	Manfaat Teoritis	21
3.2.2.	Manfaat Praktis	21
BAB 4	METODE PENELITIAN	22
4.1.	Penelitian I	22
4.1.1.	Koleksi ZP Kambing	22
4.1.2.	Identifikasi gZP3	23
4.1.3.	Isolasi gZP3	24
4.1.4.	Produksi Antibodi gZP3	24
4.1.5.	Elisa	25
4.1.6.	Analisis Data	25
4.2.	Penelitian II	26
4.2.1.	Maturasi Oosit	27
4.2.2.	Preparasi Sel Spermatozoa	28
4.2.3.	Inseminasi In Vitro	29
4.2.4.	Analisis Data	29
BAB 5	HASIL DAN PEMBAHASAN	30
5.1.	Penelitian I	30
5.1.1.	Preparasi gZP3	30
5.1.2.	Peneraan Titer Antibodi gZP3	33
5.2.	Penelitian II	35
BAB 6	KESIMPULAN DAN SARAN	40
	DAFTAR PUSTAKA	41
	LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Rancangan penelitian pengaruh penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa dan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi <i>in vitro</i> terhadap angka <i>Cleavage</i> pada fertilisasi <i>in vitro</i>	26
Tabel 2. Titer antibodi (nilai <i>Optical Density</i>) mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah imunisasi dengan 40 µg gZp3 dibandingkan kontrol	33
Tabel 3. Angka <i>Cleavage</i> embrio sapi setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit dan penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa	35

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Tahap-tahap awal fertilisasi pada mamalia.....	13
Gambar 2. Diagram alir bekerjanya IgG pada Zona Pelusida	17
Gambar 3. (a) Oosit diantara runtuh sel-sel kumulus, (b) Oosit setelah bebas dari runtuh sel-sel kumulus, (c) Zona pelusida kambing.....	31
Gambar 4. Hasil SDS-PAGE Zona Pelusida Kambing	32
Gambar 5. Kurva titer antibodi (<i>Optical Density</i>) mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah imunisasi dengan gZP3 dibandingkan kontrol dalam beberapa pengenceran	34
Gambar 6. Embrio hasil fertilisasi <i>in vitro</i> pada kontrol dan perlakuan	37

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman		
Lampiran 1.	Data Nilai <i>Optical Density</i> Hasil Uji Elisa	48
Lampiran 2.	Hasil Uji t Data Nilai <i>Optical Density</i> Elisa	48
Lampiran 3.	Uji Chi-Square Angka <i>Cleavage</i> Embrio pada Fertilisasi <i>In Vitro</i>	50