

RINGKASAN

Penelitian eksperimental laboratoris telah dilakukan melalui pemanfaatan zona pellusida 3 sapi (*bZP3*). Tujuan penelitian ini adalah untuk membuktikan timbulnya infertilitas sementara yang disebabkan oleh peran antibodi hasil induksi molekul *bZP3* yang mengalami pemutusan ikatan glikan melalui proses deglikosilasi enzimatis, untuk dasar perencanaan teknologi imunokontrasepsi.

Penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental laboratoris dengan 5 tahap penelitian : tahap I, karakterisasi glikoprotein *bZP3*, tahap II karakterisasi *bZP3dG* hasil deglikosilasi secara enzimatis dengan menggunakan enzim *N-glycanase*, tahap III adalah karakterisasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* melalui evaluasi spesifisitas reaksi menggunakan metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*, tahap IV uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* dan tahap V adalah evaluasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* sebagai penghambat fertilisasi *in vivo*.

Penelitian tahap I, karakterisasi glikoprotein *bZP3* bertujuan untuk memperoleh molekul *bZP3* dan data karakternya. Penelitian tahap ini adalah penelitian eksploratif untuk menambah data yang sudah dimiliki oleh peneliti dan data disajikan secara diskriptif. Molekul *bZP3* diperoleh melalui metode SDS-PAGE dilanjutkan dengan metode elektroelusi. Data karakter biokimiawi yang dihasilkan pada penelitian tahap I adalah glikoprotein *bZP* terdiri dari 3 pita dengan metode satu dimensi SDS-PAGE, dan menjadi 4 pita pada dua dimensi elektroforesis (IEF-SDS-PAGE) yang diberi nama *bZP1*, *bZP2*, *bZP3* dan *bZP4*. Molekul *bZP3* mempunyai kisaran berat molekul $79,995 \pm 0,051$ kDa, menggunakan metode PAS (*Periodic Acid Schiff*) diketahui setiap *bZP* mengandung glikoprotein *bZP3* sebesar $2,19 \pm 0,04$ μg yang terdiri dari karbohidrat sebesar $0,91 \pm 0,04$ μg , sedangkan kandungan protein adalah $1,28 \pm 0,08$ μg yang dianalisis menggunakan metode biuret. Selanjutnya dengan metode densitometer dikonfirmasi bahwa rasio molekul *bZP2* dan *bZP3* adalah 1:1.

Penelitian tahap II, karakterisasi *bZP3dG* hasil deglikosilasi secara enzimatis menggunakan enzim *N-glycanase*. Penelitian tahap II bertujuan untuk mendapatkan molekul *bZP3dG* dan data karakter biokimiawi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *bZP3dG* mempunyai berat molekul $50,462 \pm 0,004$ kDa dan molekul karbohidrat yang terpotong melalui proses deglikosilasi sebesar 36,92 %. Berat molekul *bZP3dG* ini sesuai apabila dikonfirmasi dengan sekuen asam amino penyusunnya yaitu sebanyak 421 asam amino.

Penelitian tahap III, karakterisasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*. Data uji spesifitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metode *Dot blot* dihasilkan data berupa noda biru keunguan yang merupakan hasil reaksi spesifik antara antigen (*bZP3* dan *bZP3dG*) dengan antibodi (anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*) dengan gradasi warna yang

tergantung pada variasi konsentrasi antigen dan antibodi. Hasil *Western blot* lebih memperjelas bahwa anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* berturut-turut adalah respon terhadap induksi *bZP3* dan *bZP3dG* yang mempunyai berat molekul $79,995 \pm 0,051$ kDa dan $50,462 \pm 0,004$ kDa. Hal ini mengindikasikan bahwa molekul *bZP3* dan *bZP3dG* berikatan secara spesifik dengan anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* hasil induksinya. Sehingga dapat diyakini bahwa data titer IgG yang terukur pada metode *indirect* ELISA adalah respon dari *bZP3* dan *bZP3dG*. Penelitian imunisasi dengan *bZP3* dan *bZP3dG* pada kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dengan jelas memperlihatkan adanya perbedaan sangat nyata ($p=0,0000$) dalam hal imunogenitasnya. Hasil analisis ragam menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata ($p=0,0000$) oleh pengaruh imunisasi *bZP3* dan *bZP3dG* terhadap nilai titer IgG yang diinduksinya. Hal ini menunjukkan bahwa hilangnya ikatan glikan atau hilangnya karbohidrat yang terikat pada rantai molekul *bZP3* dapat meningkatkan sifat imunogenik berdasar pada titer antibodi hasil induksinya.

Penelitian tahap IV, uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*. Pengikatan spermatozoa pada *bZP3* dan *bZP3dG* terjadi pada bagian akrosom spermatozoa. Tampak jelas bahwa *bioassays* yang didasarkan pada inhibisi spermatozoa berikatan pada *bZP3* dipengaruhi oleh kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* melalui gambaran berkurangnya dan menjauhnya spermatozoa terhadap reseptornya. Imunoadsorpsi dari anti-*bZP3* atau anti-*bZP3dG* dengan peptida pada molekul utuh *bZP3* atau protein inti dari molekul *bZP3* yaitu *bZP3dG* menghambat proses pengikatan spermatozoa pada reseptornya. Antibodi terhadap *bZP3* dan *bZP3dG* tampaknya ditujukan terhadap suatu *continuous amino acid sequence* dan tidak terhadap residu yang terglisosilasi. Hal ini kemungkinan karena afinitas intraseluler lebih tinggi pada antigen yang tidak terglisosilasi.

Penelitian tahap V, evaluasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* sebagai bahan penghambat fertilisasi *in vivo*. Penelitian imunisasi menggunakan *bZP3* maupun *bZP3dG* pada kelompok kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) lokal dengan jelas memperlihatkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$) terhadap imunogenesitas dan lama kembalinya induksi infertilitas yang bersifat *reversible*. Dua molekul tersebut memperlihatkan potensi imunokontrasptif *in vivo*. Secara singkat, penelitian ini telah mendemonstrasikan bahwa antigen (*bZP3dG*) mampu untuk menginduksi infertilitas jangka panjang yang bersifat *reversible*.

Dari rangkaian tahapan penelitian dapat dibuktikan bahwa *bZP3dG* berpotensi imunogenik untuk merangsang terbentuknya anti-*bZP3dG* guna menghambat pengikatan reseptor spermatozoa dan menginduksi infertilitas yang bersifat *reversible*. Disamping itu molekul *bZP3dG* adalah protein temuan baru yang diperoleh melalui proses deglikosilasi enzimatis terhadap molekul *native bZP3* yang perlu dikembangkan lebih lanjut sebagai kandidat imunokontrasepsi.

ABSTRACT

A laboratory experimental research has been conducted on *bovine zona pellucida-3 (bZP3)* as a primary reseptor of sperm. In these studies, we examined the contribution of *N-linked oligosaccharide* of *bZP3* in recognizing binding molecule on acrosomal sperm surface that plays an important role in induction of anti-*bZP3dG* antibody and further leads reversible infertility. This finding open the possibilities to develop immunocontraception.

Five research stages were conducted : stage 1, characterization of *bZP3* glycoprotein; stage II, characterization of deglycosylated *bZP3 (bZP3dG)*, stage III, characterization of antibodies to *bZP3* and *bZP3dG*, stage IV evaluation of receptor binding sperm with or without addition anti-*bZP3* and anti-*bZP3dG* and stage V, evaluation of the function of antibodies to *bZP3* and *bZP3dG* in preventing *in vivo* fertilization.

Bovine ZP3 and *bZP3dG* have molecular weights of 79.995 ± 0.051 kDa and 50.462 ± 0.004 kDa , respectivly. Each *bZP* contained 2.19 ± 0.04 μ g glycoprotein *bZP3* that consisted of 0.91 ± 0.04 μ g carbohydrate and 1.28 ± 0.08 μ g protein. By using densitometre *bZP2* : *bZP3* ratio was 1 : 1. The 36,92 % of carbohydrate has been cut succesfully by enzymatically deglycosylation. The result of *Dot blot* and *Western blot* clearly showed that antibodies to *native* and deglycosylated *bZP3* were responded to *bZP3* and *bZP3dG* that have molecular weights of 79.995 ± 0.051 kDa and 50.462 ± 0.004 kDa, respectively. Immunization studies with *native* dan *deglycosylated bZP3* on rats (*Rattus novergicus*) show significant different ($p=0.0000$) of its imunogenecity. The antibodies to *native* and *deglycosylated bZP3* inhibited sperm-egg interaction through bounding exclusively to *native* and *deglycosylated bZP3*. Immunoadsorbision of antibodies to core protein or *bZP3* inhibit binds sperm to its receptor, on acrosomal sites of sperm. Immunization of both *native* and *deglycosylated bZP3* on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were able to induce reversible long term infertility, and has significant different ($p=0.0000$) in its immunogenecity. Both molecules certainly can be developed as immunocontraception.

It can be concluded that *deglycosylated bZP3* or protein core of *bZP3* effectively induces high titre antibodies which inhibit sperm-egg interaction and induces long term reversible infertility. In addition *bZP3dG* molecule is a new protein obtained by enzymatically deglycosylation process of *native bZP3*. This molecule is needed to be further developed as candidate of immunocontraception

Key words : *bovine Zona Pellucida-3 (bZP3)*, *bZP3dG*, deglycosylation, immunocontraception, fertilization.