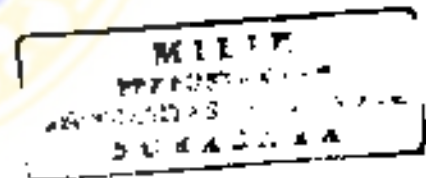


DISERTASI

ANALISIS ANTIBODI HASIL INDUKSI BOVINE ZONA PELLUSIDA-3 TERDEGLIKOSILASI (bZP3dG) UNTUK PENGEMBANGAN IMUNOKONTRASEPSI

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

D₀
K 19/04
Aul
d



AJLANNI 'AM

PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2003

**ANALISIS ANTIBODI HASIL INDUKSI
BOVINE ZONA PELLUSIDA-3 TERDEGLIKOSILASI (bZP3dG)
UNTUK PENGEMBANGAN IMUNOKONTRASEPSI**

Dis
K-15/04
Aul
a

DISERTASI

Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Senin
Tanggal : 11 Agustus 2003
Pukul 10.00 WIB



Oleh :

AULANNI 'AM
NIM. 090013728 D

Lembar Pengesahan

Disertasi ini telah disetujui pada tanggal 11 Agustus 2003

Oleh
Promotor



Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranojoto, drh., MSc
NIP. 130 189 851

Ko-Promotor



Prof. Sutiman B. Sumitro, SU, DSc
NIP. 130 809 123

Mengetahui

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran
Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga



Prof. Dr. Hj. Juliati Hood A., dr., MS., SpPA., FIAC.
NIP. 130 517 159

Disertasi ini telah diuji pada

Tanggal 23 April 2003

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Dr. A. Duran Corebima

Anggota : Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh. MSc.

Prof. Suliman B. Sumitro, SU., DSc.

Aucky Hinting, dr., PhD.

Soetjipto, dr. MS., PhD.

Dr. Kuntoro, dr., MPH.

Dr. Fedik A. Rantam, drh.



Sesuai Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga

Tentang Panitia Penguji Disertasi

Nomor : 3769/JO3/PP/2003

Tanggal, 5 Mei 2003

UCAPAN TERIMAKASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat ALLAH SWT atas segala rahmad dan karuniaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof. Dr. H. Soehartojo Hardjopranjoto, drh., MSc., selaku promotor beliau telah menghantarkan saya melewati jenjang pendidikan tertinggi. Beliau senantiasa menyediakan waktu untuk membimbing dengan penuh kesabaran, perhatian dan senantiasa mendorong semangat serta meningkatkan rasa percaya diri saya. Dari beliau saya mendapat wawasan keilmuan bagaimana seharusnya menjadi seorang ilmuwan bersikap dan mengamalkan ilmunya sesuai dengan tanggung jawabnya kepada Allah SWT. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmad dan hidayahNya serta melipat gandakan pahalaNya kepada beliau

Terimakasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof. Suliman Bambang Sumitro, SU., DSc., selaku Ko-Promotor yang selalu menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan dengan penuh kesabaran mendorong saya untuk selalu berpandangan ke depan dalam mengikuti perkembangan ilmu, mengajari dan membimbing dalam meningkatkan kemampuan melakukan pekerjaan di laboratorium. Dari beliau saya mendapat wawasan keilmuan bagaimana seharusnya menjadi seorang ilmuwan bersikap dan mengamalkan ilmunya sesuai dengan tanggung jawabnya kepada Allah SWT. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmad dan hidayahNya serta melipat gandakan pahalaNya kepada beliau

Saya ucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia ex Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial, sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan disertasi ini.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankan saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., SpB.TKV, serta mantan Rektor Prof. H. Soedarto, dr., DTM&H, PhD, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Muh Amin, dr., SpP(K) dan mantan Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Dr. Soedjono Tirtowidarjo, dr., SpTHT., yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof. Dr. Hj. Julianti Hood A., dr., MS, SpPA., FIAC selaku ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, atas nasehat dan perhatian yang diberikan kepada saya selama saya mengikuti Program Doktor.

Ungkapan terima kasih saya sampaikan kepada Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. Bambang Gunitno, Ir dan mantan Rektor Universitas Brawijaya Prof. Dr. H. Eka Afnan Troena, SE, atas ijin yang diberikan

kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga

Kepada Dekan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya H. Adam Wiryawan, Ir., MS dan mantan Dekan Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Prof. Sutiman B. Sumitro, SU., DSc. Saya ucapkan terimakasih atas ijin dan dorongan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga

Ungkapan terimakasih juga saya sampaikan kepada .

Kepada Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya Uswatun Hasanah, Ir., MSi dan Warsito, Drs., MS, mantan ketua jurusan Kimia FMIPA serta Dr. Hermin Sulistyarti MSc., sekretaris Jurusan Kimia FMIPA yang selalu memberi semangat untuk menyelesaikan pendidikan Program Doktor. Juga kepada seluruh staf dan karyawan Jurusan Kimia FMIPA Universitas Brawijaya saya ucapkan terimakasih atas perhatiannya selama saya menempuh pendidikan Program Doktor.

Kepada Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya Serafinah Indryani, Dra., MSi juga kepada seluruh staf dan karyawan Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya saya ucapkan terimakasih atas perhatiannya selama saya menempuh pendidikan Program Doktor

Kepala Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya Anna Roosdiana, Dra. MApp Sc; atas ijin dan fasilitas serta yang mendorong saya untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga. Juga saudara Mar yono atas bantuannya yang tak pernah lelah selama penelitian yang saya lakukan.

Pelaksana Harian Laboratorium Biologi Molekuler FMIPA Universitas Brawijaya Sri Widayati, Dra., MSi, atas kerjasamanya yang sangat baik selama bekerja di laboratorium. Sekaligus saya ucapkan terimakasih kepada Sdr. Harmaji atas bantuannya dalam perawatan hewan coba

Kepala Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya serta Pelaksana harian Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Prof. Dr. Mulyahadi Ali dr dan Loeki Enggar Fitri, dr. Mkes atas fasilitas dan kerjasamanya yang sangat baik selama bekerja di laboratorium. Sekaligus saya ucapkan terimakasih kepada staf biomedik Wibr. Riawan, SS

Ucapan terimakasih yang sedalam-dalamnya saya sampaikan kepada seluruh staf laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Brawijaya : H. Chanif Mahdi, Ir., MS; H. Sasangka P., Drs., MS; Soetrisno, Drs. Msi, dan Arie Srihardyastutie, SSi MSi, yang selalu memberi semangat kepada saya untuk menyelesaikan Program Doktor

Kepada guru-guru saya sejak sekolah Taman Kanak-kanak, Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, serta para dosen saya di Fakultas Kedokteran Hewan dan Faculté de Sciences et Technique Languedoc, l'université de Montpellier II Perancis saya sampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas didikan dan bimbingannya. Semoga Allah SWT melimpahkan rahmad dan hidayahNya

Ungkapan rasa terima kasih saya sampaikan kepada para Dosen dan panitia penguji dari ujian kualifikasi sampai ujian tahap 1 di Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof. Purnomo Suryohusodo, dr, Prof

Eddy Pranowo Soedibyo, dr. MPH Prof. Dr. H. J. Glinka, SVD; Prof. Bambang Rahno, dr. Prof. Dr. Soetandyo Wignyo Soebroto, MPA; Prof. DR. Koento Wibisono Siswomihardjo Prof. Dr. Sarmanu, drh., MS; Prof. Dr. A. Zamuddin, Drs. Apt, Dr. Kuntoro dr. MPH, Prof. Dr. Soehartono Taat Putra, dr., MS; Widodo J. Pudjirahardjo dr., MS, MPH, DrPH, Siti Priani, dr. MPH, PhD; Fuad Amsyari, dr. PhD; Dr. L. Dison, Soetjipto, dr., MS, PhD Aucky Hinting, dr., PhD, Mas'ud Hariadi, drh., M.Phil., PhD; Dr. Fedik A. Rantam, drh; Dr. Trinit Susilawati, Ir. MS Prof. Dr. A. Duran Corebima yang telah menambah pengetahuan dan wawasan keilmuan saya selama mengikuti Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Menteri Kesehatan Republik Indonesia yang memberi kepercayaan saya sebagai anggota peneliti dalam penelitian Vaksin Reproduksi pada tahun 1999 - 2000, sehingga sangat membantu saya dalam menyelesaikan Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga

Triono Soendoro dr., PhD atas penyediaan literatur dan dukungannya kepada saya untuk menyelesaikan Program Doktor di Pascasarjana Universitas Airlangga

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, yang memberi kepercayaan saya sebagai peneliti pengembangan vaksin imunokontrasepsi dengan pemanfaatan *bovine zona pellusida*, melalui Dana Penelitian Hibah Bersaing IX/1, IX/2 dan XI, sehingga saya dapat melakukan penelitian secara berlanjut untuk pengembangan imunokontrasepsi.

Kepada para peneliti yang tergabung dalam penelitian vaksin reproduksi yang didanai Litbang Kesehatan, Prof. Sutiman B. Sumitro, DSc, Triono Soendoro, dr., PhD, Aucky Hinting, dr., PhD; Dr. Trinit Susilawati, Ir., MS Dr. M. Sasmito Djati Ir., MS dan Gatot Ciptadi, Ir., DESS saya ucapkan terimakasih atas bantuan, diskusi dan kerjasamanya selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor

Kepada anggota peneliti yang tergabung dalam penelitian pengembangan vaksin imunokontrasepsi yang didanai oleh Penelitian Hibah Bersaing IX/1, 2 dan XI yaitu Prof. Sutiman Bambang Sumitro, Dr. M. Sasmito Djati Ir., MS Sutiyoso, dr., SpOG dan Gatot Ciptadi, Ir., DESS saya ucapkan terimakasih atas bantuan, diskusi dan kerjasamanya selama saya mengikuti pendidikan Program Doktor

Kepada Marji, Drs., Mkes, Fakultas Teknik Universitas Negeri Malang dan Didik, Ir., MSc, staf peneliti Balitkabi, Malang dan Prof. Dr. A. D. Corebima yang membantu dan memberikan masukan berkaitan dengan analisis statistik data untuk penyelesaian disertasi ini

Kepada teman-teman sekelas peserta pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga yaitu Teddy Ontoseno dr. SpA, SpAK, SpJp. (Komting)

Achmad Sjarwani, dr., SpB., SpBO, Mohamad Saiful Islam, dr., SpS, Moh. Hasan Machfoed, dr., MS, Ariyanta Harsana, dr., SpA, SpAK, Hud. Wnarso, dr., MS, SpAnd, C. A. Nidom, drh., MS, Puji Srianto, drh., Mkes., Gempur Santoso, Drs., MS, Marji, Drs., MS, Sugiharto, Drs., MS, Slamet Riyad, drh., Mkes., Hadi Ismono, dr., Mkes, Didik Budiyanto, drh., Mkes, Anwar Ma'ruf, drh., Mkes, Hj. Djelita Rickum, SKM, Mkes, Dot

Wahyuningsih, dr Mkes., Sulistiana Prabowo, dr , Mkes., Sri Kunarti, drg , MS A Retno Puji Rahayu, drg , Mkes . Theresia Indah Budhy, drg , Mkes Indah Listiana Kriswandini, drg., Mkes , Ikeu Ekayanti, Ir , Mkes , Sri Sulistyorini, Dra., MPd., Sri Wahyuningsih, Ir., MSi., Minsya T Djailing, Drs., Mkes , Kustiyo Gunawan, dr , SpB , SpBA , Syahminan, Drs., MS., Timbul Supodo Drs., Mkes. dan Dasrul, drh., Mkes saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kebersamaan berbagi rasa suka dan duka, berbagi pengalaman dalam keilmuan serta kerja samanya yang teramat baik

Ungkapan rasa terimakasih dan penghargaan yang tiada tara tingginya saya haturkan kepada almarhum ayah saya Moertadj yang tidak sempat melihat keberhasilan saya dan ibu saya Malichah yang saya cintai, dengan kasih sayang telah membesarkan, mengayomi, mendidik, dan tak henti-hentinya mendoakan saya untuk mampu menyelesaikan pendidikan Program Doktor sebagai jenjang pendidikan tertinggi dan untuk menjadi manusia yang berguna bagi agama, bangsa dan negara. Demikian juga kepada kakak-kakak, adik-adik serta keponakan saya yang telah memberi semangat kepada saya untuk dapat menyelesaikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Terimakasih saya haturkan kepada almarhumah Hj. Sorini Soehartoyo, drh; Hj Tintrim Rahayu, Ir; H Soewignjo, Drs sekeluarga; Djoko Wahono Soeatmadji, dr, SpPD, KE; Prof Hari Purnomo, Ir, M AppSc, PhD serta Amy MS Putri sekeluarga, yang selalu memberikan semangat dan doa kepada saya dalam menyelesaikan program Doktor di Universitas Airlangga

Terimakasih juga saya sampaikan kepada sdr. Atok Budi TS yang dengan penuh kesabaran dan dengan ketrampilannya dibidang desain grafis yang telah begitu banyak membantu saya dalam menyelesaikan penulisan naskah disertasi saya

Terimakasih kepada semua teman sejawat dan laboran dari Laboratorium Fisiologi Reproduksi dan laboratorium Kebidanan FKH Unair khususnya Pudji Srianto, drh , Mkes; Sri Pantja M, drh ,Mkes. Imam Mustofa, drh., Mkes, Ismau SKH, serta Sdr Surti yang telah membantu lancarnya penyiapan sampel penelitian untuk menyelesaikan program Doktor ini

Terimakasih kepada Indah L Kriswandini, drg , MS yang telah membantu lancarnya rangkaian proses ujian kualifikasi, usul disertasi, kelayakan dan ujian tahap 1, serta sejawat Rias Diah Tri Silvana, drh , MM dan Roesmiat Wisindie, drh , atas partisipasinya dalam menyiapkan prosesi promosi ujian terbuka

Terimakasih kepada teman-teman saya alumni SMU Negeri I Tuban, dan FKH Universitas Airlangga yang selalu mendorong saya untuk menyelesaikan Program Doktor ini.

Akhirnya kepada semua pihak, teman sejawat yang tidak saya sebutkan satu persatu yang telah membantu selama masa pendidikan saya, saya sampaikan terimakasih setinggi-tingginya, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmad dan karuniaNya. Amin

RINGKASAN

Penelitian eksperimental laboratorium 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 kontracepsi.

Penelitian yang dilakukan adalah studi eksperimental laboratorium 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 spesifitas 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 deskriptif. Molekul *bZP3* diperoleh melalui metode SDS-PAGE dilanjutkan dengan metode elektroelusi. Data karakter biokimiawi yang dihasilkan pada penelitian tahap I adalah glikoprotein *bZP3* 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 $2,19 \pm 0,04$ μ g yang terdiri dari karbohidrat sebesar $0,91 \pm 0,04$ μ g, sedangkan kandungan protein adalah $1,28 \pm 0,08$ μ g 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 sekuens 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 terlikosilasi. Hal ini kemungkinan karena afinitas intrasetuler lebih tinggi pada antigen yang tidak terlikosilasi.

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 receptor of sperm. In these studies, we examined the contribution of *N-linked oligosacchande* 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 I, 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, respectively. 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 successfully 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 norvegicus*) show significant different ($p=0.0000$) of its immunogenicity. The antibodies to native and deglycosylated bZP3 inhibited sperm-egg interaction through bounding exclusively to native and deglycosylated bZP3. Immunoabsorption of antibodies to core protein of 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 immunogenicity. 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.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Sampul Depan	i
Halaman Sampul dalam	ii
Lembar Pengesahan	iii
Penetapan Panitia	iv
Ucapan Terimakasih	v
Ringkasan	ix
Abstrak	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xxi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Morfologi Dan Organisasi Genomik Zona Pellusida	8
2.2. Biosintesis Zona Pellusida	13
2.3. Immunogenisitas Dari Zona Pellusida	15
2.4. Komposisi Karbohidrat Dalam Glikoprotein Zona Pellusida	17
2.5. Deglikosilasi Pada Molekul glikoprotein Zona Pellusida	20
2.6. Fertilisasi	24
2.7. Peran Zona Pellusida 3 Dalam Proses Fertilisasi	28
2.8. Antibodi terhadap ZP3 Dan Penghambatan Fertilisasi	36
BAB 3. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	39
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian	39
3.2. Hipotesis Penelitian	40
BAB 4. METODE PENELITIAN	43
4.1. Rancangan Penelitian	43
4.2. Populasi Dan Sampel Penelitian	50
4.3. Variabel Penelitian	51
4.3.1. identifikasi Variabel Penelitian	51
4.3.2. Definisi Operasional Variabel	52
4.4. Bahan Penelitian	53
4.5. Lokasi Penelitian	55

	Halaman
4.6. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian	55
Penelitian 1 Karakterisasi <i>bZP3</i> Dari Oosit Sapi	55
Metode Pengumpulan Ovarium	55
Metode Pengumpulan Oosit	56
Metode Isolasi Zona Pellusida Sapi (<i>bZP</i>)	57
Metode Isolasi <i>bZP3</i>	57
Metode Karakterisasi Biokimiawi <i>bZP3</i>	58
Penelitian 2 : Deglikosilasi Molekul <i>bZP3</i> Dan Karakterisasi <i>bZP3dG</i>	62
Metode Deglikosilasi <i>bZP3</i>	62
Metode Karakterisasi Biokimiawi <i>bZP3dG</i>	63
Penelitian 3 : Karakterisasi Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i> Hasil Induksi oleh <i>bZP3</i> Dan <i>bZP3dG</i>	63
Imunisasi Tikus Menggunakan <i>bZP3</i> Dan <i>bZP3dG</i>	63
Pengambilan Serum	65
Pemanenan Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i> Dari Serum	65
Pengukuran Titer Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i>	66
Metode Dot Blot	67
Metode Western Blot	67
Penelitian 4 : Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i>	68
Penyiapan Spermatozoa	68
Metode Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa	68
Penelitian 5 . Evaluasi Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i> Sebagai Penghambat Fertilisasi <i>In Vivo</i>	69
Penyiapan Hewan Coba	70
Metode <i>Flushing</i> Embrio	70
4.7. Analisis Data	71
Kerangka Operasional Penelitian	74
BAB 5. HASIL PENELITIAN	75
5.1 Karaktensasi Glikoprotein <i>bZP3</i>	76
5.2 Karakterisasi <i>bZP3dG</i> Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim <i>N-glycanase</i>	82

	Halaman
5.3. Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Immunologis Menggunakan Metode <i>Dot Blot</i> , <i>Western Blot</i> Dan <i>indirect</i> ELISA	84
5.3.1. Uji Spesifitas Anti-bZP3 Terhadap bZP3 Dan Anti-bZP3dG Terhadap bZP3dG Melalui Metode <i>Dot blot</i> Dan <i>Western Blot</i>	84
5.3.2. Uji Spesifitas Anti-bZP3 Terhadap bZP3 Dan Anti-bZP3dG Terhadap bZP3dG Melalui <i>indirect</i> ELISA	89
5.3.2.1. Analisis Statistik Uji Spesifitas Anti-bZP3 Terhadap bZP3 Dan anti-bZP3dG Terhadap bZP3dG Melalui <i>Indirect</i> ELISA	90
5.4. Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG.	94
5.5. Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai Penghambat Fertilisasi <i>In Vivo</i>	98
5.5.1. Analisis Statistik Profil IgG Hasil induksi bZP3 Dan bZP3dG Terhadap bZP3dG Pada Kelompok Hewan Coba Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Melalui <i>Indirect</i> ELISA	100
Bab 6. PEMBAHASAN	110
6.1. Karakterisasi Glikoprotein bZP3	110
6.2. Karakterisasi bZP3dG Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Dengan Enzim <i>N-glycanase</i>	116
6.3. Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Immunologis Menggunakan Metode <i>Dot Blot</i> , <i>Western Blot</i> Dan <i>Indirect</i> ELISA	118
6.4. Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG	125
6.5. Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai Penghambat Fertilisasi <i>in Vivo</i>	129
Bab 7. KESIMPULAN DAN SARAN	137
1.1. Kesimpulan	137
1.2. Saran	138
DAFTAR PUSTAKA	139
Lampiran	149

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
2.1.	Struktur Glikoprotein Zona Pelusida Yang Berpentuk Filamen	12
2.2.	O-Linked Saccharide Dan N-Linked Saccharide	19
2.3.	Hipotesa Struktur Molekul Glikan Pada ZP3 Tikus	21
2.4.	Hidrolisis Molekul Glikan Yang Terikat Pada Asparagin (Asn) Dalam Rantai Polipeptida	22
2.5.	Ilustrasi ZP3 Sebagai Reseptor Spermatozoa Berikatan Dengan Galatase-I Pada Permukaan Akrosom Spermatozoa	23
2.6.	Skema Model Proses Fertilisasi	26
2.7.	Interaksi Protein ZP3 Dengan Ligannya Pada Membran Spermatozoa	27
2.8.	Jalur Induksi Zona Pelusida Pada Reaksi Akrosom	34
3.1.	Skematis Kerangka Konseptual Penelitian	42
4.1.	Bagan Rancangan Penelitian 1: Karakterisasi Glikoprotein bZP3	44
4.2.	Bagan Rancangan Penelitian 2: Karakterisasi bZP3dG Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Dengan Menggunakan Enzim N-Glycanase	45
4.3.	Bagan Rancangan Penelitian 3: Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Menggunakan Metode Dot Blot, Western Blot Dan Indirect ELISA	46
4.4.	Bagan Rancangan Penelitian 3 Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG.	47
4.5.	Bagan Rancangan Penelitian 5: Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai Penghambat Fertilisasi <i>In Vivo</i>	48
4.6.	Kerangka Operasional Penelitian	74
5.1.	Oosit Yang Dipakai Untuk Mendapatkan Isolat bZP3 Dengan Pewarnaan Hoescht – Propidium Iodid	76
5.2.	Pita Glikoprotein Dari bZP Hasil SDS-PAGE 10 %	77
5.3.	Pita Glikoprotein Dari bZP3 Hasil Elektrolisis Dengan Metode SDS-PAGE 10 %	78
5.4.	Pita Glikoprotein Dari bZP3 Hasil Dua Dimensi Elektrofresis (IEF-SDS-PAGE) 10 %	79
5.5.	Densitogram Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pita Glikoprotein Hasil SDS-PAGE 10 %	80
5.6.	Densitogram Glikoprotein bZP Hasil SDS-PAGE 10%	81

Gambar		Halaman
5.7	Pita <i>bZP3dG</i> Dengan Metode SDS-PAGE 10 % Melalui Pewarnaan Commassie Brilliant Blue R-250	83
5.8.	Uji Spesifitas <i>bZP3</i> Terhadap Anti- <i>bZP3</i> Menggunakan Metode <i>Dot Blot</i> .	85
5.9	Uji Spesifitas <i>bZP3dG</i> Terhadap Anti- <i>bZP3dG</i> Menggunakan Metode <i>Dot Blot</i> .	85
5.10	Uji <i>Western Blot</i> Antar Molekul <i>bZP3</i> Dengan Anti- <i>bZP3</i>	87
5.11	Uji <i>Western Blot</i> Antar Molekul <i>bZP3gG</i> Dengan Anti- <i>bZP3dG</i>	88
5.12.	Profil Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i> Pada Kelompok Tikus Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Wistar	89
5.13	Peran Anti- <i>bZP3</i> Dalam Uji Penghambatan Pengikatan Reseptor Spermatozoa	96
5.14	Peran Anti- <i>bZP3dG</i> Dalam Uji Penghambatan Pengikatan Reseptor Spermatozoa	97
5.15.	Profil Titer Anti- <i>bZP3</i> Dan Anti- <i>bZP3dG</i> Pada Kelompok Kelinci Lokal	99
5.16.	Evaluasi Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi <i>bZP3</i> Dan <i>bZP3dG</i> Pada Kelompok Kelinci Lokal	100
5.17.	Embrio Fase Morula	106
6.1	Reaksi Biuret	111
6.2.	Reaksi PAS (<i>Periodic Acid Schiff</i>)	113

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
2.1.	Sekuen Asam Amino Yang Dipertahankan Pada Beberapa Mamalia	10
5.1.	Karakter Biokimiawi <i>Bovine Zona Pellusida</i> (bZP) Dan <i>Bovine Zona Pellusida-3</i> (bZP3)	82
5.2.	Hasil Analisis Ragam Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Tikus Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Wistar.	90
5.3.	Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%) Rerata Titer IgG Pada Kelompok Tikus Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) Yang Mendapat Imunisasi bZP3 Dan bZP3dG.	91
5.4.	Hasil Uji Beda Nyata 1% (BNT 1%) Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Terhadap Lama Imunisasi Yang Berbeda Pada Kelompok Tikus Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>) Galur Wistar	92
5.5.	Hasil Uji Beda Nyata 1% Interaksi Jenis imunogen Dan Lama Imunisasi Pada Jantan (<i>Rattus norvegicus</i>)	93
5.6.	Hasil Analisis Ragam Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal.	101
5.7.	Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%) Rerata Titer IgG Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Yang Mendapat Imunisasi bZP3 Dan bZP3dG	102
5.8.	Hasil Uji Beda Nyata Terkecil 1% (BNT 1%) Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Lama Imunisasi Yang Berbeda Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal.	103
5.9.	Hasil Uji Beda Nyata 1% (BNT 1%) Terhadap Interaksi Antara Jenis imunogen Dan Lama Imunisasi Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal	104
5.10.	Hasil Analisis Ragam Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi Oleh bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal.	107
5.11.	Hasil Uji Beda Nyata Terkecil 1% (BNT 1%) Interaksi Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi Oleh bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal.	108

Tabel		Halaman
L.3.1.	Komposisi Protein Standar Pada Absorbansi 550nm	168
L.3.4.1.	Nilai Absorbasi Larutan Standar BSA 5000 ppm Pada Penentuan Panjang Gelombang Maksimum	172
L.3.5.1.	Kandungan Protein Sampel <i>bZP</i>	175
L.3.6.1	Kandungan Protein Sampel <i>bZP3</i>	177
L.4.1	Nilai Rf Dan Berat Molekul Protein Standar	178
L.4.2.	Nilai Berat Molekul Dari Pita-Pita Sampel <i>bZP</i>	180
L.4.3.	Nilai Berat Molekul Dari Pita Sampel <i>bZP3dG</i>	181
L.5.1.	Kualitas Semen Sapi	182
L.12.1	Rataan Jumlah Folikel Pada Jaringan Ovarium Kelinci Pasca Imunisasi Protein <i>bZP</i> (Mahriani, 2002)	189
L.13.1.	Publikasi Nasional dan Internasional Yang Mendukung Disertasi ini	190



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1.	Pembuatan Reagensia 149
2.	Diagram Alur Percobaan 157
2.1.	Diagram Alur Koleksi Cairan Folikel 158
2.2.	Diagram Alur Koleksi Oosit 159
2.3.	Diagram Alur Isolasi Zona Pellusida Sapi 160
2.4.	Penyiapan Sampel bZP Untuk Pengukuran Kandungan Protein, Glikoprotein Dan Karbohidrat 160
2.5.	Pengukuran Protein Metode Biuret 161
2.5.1.	Pengukuran Kurva Standar BSA 161
2.5.2.	Pengukuran Kandungan Protein Sampel bZP Dan bZP3 161
2.6.	Pengukuran Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat 162
2.7.	Penentuan Berat Molekul Dengan SDS-PAGE 163
2.8.	Isolasi Dan Purifikasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG 164
2.9.	Uji <i>Dot Blot</i> bZP3 Atau bZP3dG Dengan Anti-bZP3 Atau Anti- bZP3dG 165
2.10.	Uji <i>Western Blot</i> bZP3 Dengan Anti- bZP3 Dan bZP3dG Dengan Anti-bZP3dG 166
2.11.	Uji Pengikatan Reseptor Dengan Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Penambahan Anti- bZP3 Dan Anti-bZP3dG 167
3.	Pengukuran Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat bZP dan bZP3 168
3.1.	Protein Standar 168
3.2.	Perhitungan Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat bZP 168
3.3.	Perhitungan Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat bZP3 170
3.4.	Pembuatan Kurva Standar BSA Dan Pengukuran Kadar Protein bZP 172
3.4.1.	Pembuatan λ Maksimum Larutan BSA 5000 ppm 172
3.4.2.	Pembuatan Kurva Standar BSA 173
3.5.	Perhitungan Kandungan Protein bZP 174
3.6.	Perhitungan Kandungan Protein bZP3 176
4.	Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul Protein Standar Dan Penentuan Berat Molekul Sampel Glikoprotein ZP3 Dan Protein bZP3dG 178
4.1.	Pembuatan Kurva Standar Berat Molekul Protein Standar 178
4.2.	Perhitungan Berat Molekul Sampel bZP3 (SDS-PAGE Satu Dimensi) 179

Lampiran	Halaman	
4.3.	Perhitungan Berat Molekul Sampel Protein <i>bZP3cG</i> (Satu Dimensi Elektroforesis)	181
5.	Hasil Pemeriksaan Kualitas Semen Sapi	182
6.	Data embrio Kelinci Pasca imunisasi Dengan <i>bZP3</i> Dan <i>bZP3dG</i>	183
7.	Sequen asam amino bovine Zona Pellucida- 3 (NCBI, 2002)	184
8.	Data ELISA Titer Antibodi (IgG) Pada Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	185
9	Hasil Analisis Interaksi 3 jenis imunogen (<i>Freund's</i> <i>Adjuvant</i> , <i>bZP3</i> dalam <i>Freund's Adjuvant</i> <i>bZP3dG</i> dalam <i>Freund's Adjuvant</i>) Dengan 15 Variasi Lama imunisasi Pada Kelompok Tikus (<i>Rattus norvegicus</i>)	186
10.	Data ELISA Titer antibodi (IgG) Pada Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).	187
11	Hasil Analisis Interaksi 3 jenis imunogen (<i>Freund's</i> <i>Adjuvant</i> , <i>bZP3</i> dalam <i>Freund's Adjuvant</i> dan <i>bZP3dG</i> dalam <i>Freund's Adjuvant</i>) Dengan 15 Variasi Lama imunisasi Pada Kelompok Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Lokal	188
12	Pengamatan Jumlah Folikel Jaringan Ovarium Kelinci Pasca Imunisasi Dengan Beberapa Kulitas Protein ZP sapi	189
13.	Publikasi Ilmiah	190

DAFTAR SINGKATAN

AA	: Arachidonic Acid
Ab	: Antibodi
Ac	: Adenylate Cyclase
ADAM	: A Disintegrin and A Metalloproteinase
Ag	: Antigen
Anti- <i>b</i> ZP3	: Antibodi terhadap <i>b</i> ZP3
Anti- <i>b</i> ZP3dG	: Antibodi terhadap <i>b</i> ZP3 terdeglikosilasi
AP	: Alkaline Phosphatase
APS	: Ammonium persulfat
Asn	: Asparagin
AS-A	: <i>Arylsulfatase A</i> .
BNT	: B eda N yata T erkecil
BSA	: Bovine serum Albumin
BO medium	: Bracket and Oliphant's Medium
<i>b</i> ZP3	: Bovine Zona Pellusida-3
<i>b</i> ZP3dG	: Bovine Zona Pellusida-3 Terdeglikosilasi
cAMP	: <i>cyclic</i> Adenosin Mono Phosphate
CFA	: Compleet Freund's Adjuvant
CBB G-250	: Commasie Brilliant Blue G-250
Ch	: Choline
Da	: Dalton
DAG	: diacylglycerol
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FA	: Freund's Adjuvant
Fuc	: Fucose
Galt-1	: β 1,4-galactosyltransferase
GlcNAc	: Glucosamin Neuramic Acid
HCl	: Asam Chlorida
IEF	: Iso electric Focusing
IFA	: In Compleet Freund's Adjuvant
IgG	: Immunoglobulin G
IP3	: Inositol Triphosphate
IP4	: Inositol tetraphosphate
kDa	: Kilo Dalton
LC	: Lysophosphatidyl choline
Man	: Mannose
NGPS	: Neoglycoprotein
PA	: Phosphatidil Acid
PAS	: Periodic Acid Schiff
PBS	: Phosphat Buffer Saline
PBS-T	: Phosphat Buffer Saline-Tween
PC	: Phosphatidyl Choline
PIP	: Phosphatidilinosito diphosphate
PLA	: Phospholipase A
PLC	: Phospholipase C

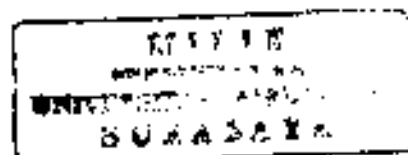
PK	: Protein Kinase
p-NPP	: <i>para</i> -Nitrophenyl Phosphate
PMSF	: Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride
pN	: piko Newton
PUSVETMA	: Pusat Veterinaria Farna
pZP3	: pig Zona Pellucida-3
Rf	: Retardation Factor
RPH	: Rumah Potong Hewan
Rpm	: Return per minute
SAS	: Saturated Ammonium Sulphate
SDS-PAGE	: Sodium Deodocyl Suphonat Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
Ser	: Serin
Sp56	: The 56-kDa galactose-binding protein
TEMED	: N,N,N,N-Tetra Methyl Diamine
TFMS	: Trifluoro methanesulfonic acid
Thr	: Threonin
TRIS-Cl	: Tris-hydroxy-aminomethane-chloride
TK	: Tyrosin Kinase
ZP	: Zona Pellusida
Zrk	: Zona receptor kinase



BAB 1**PENDAHULUAN****1.1. Latar Belakang Penelitian**

Pengembangan suatu imunokontrasepsi masih terus dilakukan terhadap masalah pertumbuhan penduduk, satwa liar yang dilindungi dan hewan peliharaan (Mate and McCartney, 1998). Data populasi manusia mencapai 6 milyar pada bulan oktober 1999, hal ini berarti kenaikan 2 kali dibandingkan populasi tahun 1960, dan apabila dipertungkan terjadi kenaikan 77 juta per tahun (data WHO dalam Delves *et al.*, 2002). Induksi respon imun oleh antigen yang berperan terhadap interaksi gamet secara spesifik merupakan salah satu pendekatan untuk pengembangan imunokontrasepsi.

Sel telur (ovum) mamalia dilindungi oleh suatu selaput yang disebut Zona Pellusida (ZP), tersusun atas beberapa jenis glikoprotein pada tiap spesies, yang diberi nama ZP1, ZP2, ZP3 dan ZP4. Aulani¹ *et al.* (2001) berhasil melakukan isolasi ZP dari sapi melalui metode SDS-PAGE yang dilanjutkan dengan metode elektroelusi terhadap pita-pita glikoprotein hasil gel elektroforesis. Zona Pellusida merupakan matriks ekstraseluler yang berperan penting pada interaksi spermatozoa dengan sel telur untuk mengawali proses fertilisasi, sehingga menjadi subyek yang banyak dipelajari untuk dapat dikembangkan menjadi calon imunokontrasepsi (Barber *et*



et al., 2000; Paterson et al., 2000). Interaksi ini melibatkan reseptor yang ada pada permukaan ZP, sehingga ZP menjadi langkah yang menarik untuk upaya pengembangan terhadap pendekatan baru metode imunokontrasepsi berdasarkan terjadinya penghambatan reaksi antara sel telur (ovum) dan spermatozoa (Burkin and Miller, 2000). *Porcine zona pellusida* (pZP) telah diteliti mempunyai efek imunokontrasepsi terhadap beberapa spesies mamalia (Barber et al., 2000). Hal ini mengingat bahwa antibodi terhadap ZP dapat menekan efektifitas fertilisasi karena selain bersifat *self reactive* terhadap individu yang diimunisasi juga mengenali spesies lain (Greenhouse et al., 1999, Topfer-Petersen et al., 2000; Tulsiani, 2000; Sumitro, et al., 2001). Hal ini dinyatakan pula oleh Hasegawa dan Koyama (1996) maupun Hirsch et al., (1999) bahwa ZP3 memiliki tingkat mempertahankan sekuen asam amino yang tinggi di antara klas mamalia, dan mempunyai kesamaan sekuen asam amino lebih dari 66 % apabila diperbandingkan antara mencit, hamster dan manusia (Scobie et al., 1999; Zhu and Naz, 1999; Skinner et al., 1999).

Brewis and Wong (1999) dan Tulsiani (2000) menyatakan bahwa ZP3 dan tikus (mZP3) merupakan reseptor spermatozoa primer pada proses fertilisasi. Molekul ZP ini terglykosilasi dan mengandung unit yang dikenal dengan "*N-linked dan O-linked oligosaccharide*" (Hirsch and Elwira, 1999; Loeser and Tulsiani, 1999; Skinner et al., 1999, Tulsiani, 2000 dan Dunbar et al., 2001).

Hasil penelitian Aulanni'am *et al* (2002) melaporkan keberadaan karbohidrat pada molekul bZP3 secara kuantitatif dan kualitatif melalui metode "Periodic acid –Schiff-Reaction" (PAS-Reaction). Selanjutnya isolat bZP3 mampu menginduksi antibodi terhadap bZP3 (anti-bZP3) dan dapat menghambat proses fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan sel telur dan spermatozoa dari sapi dan kambing (Sumitro and Aulanni'am, 2000; Sumitro *et al.*, 2002). Beberapa peneliti lain juga telah melakukan penelitian tentang antibodi poliklonal terhadap molekul utuh glikoprotein ZP3 baik secara fertilisasi *in vivo* maupun *in vitro*. Namun data penelitian tersebut melaporkan masih diikuti dengan timbulnya gangguan patologi ovarium dan penurunan jumlah folikel primordial. Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Sumitro *et al* (2001) bahwa ada variasi kerusakan gambaran histologis berdasar pengamatan derajat penurunan folikel primordial dan ovarium kelinci yang mendapat imunisasi kualitas bZP3 yang berbeda. Namun kelompok kelinci yang mendapat imunisasi bZP3 mempunyai gambaran histologis yang hampir menyerupai kelompok hewan kontrol, yaitu kelompok hewan coba kelinci yang hanya mendapat imunisasi *Freund's adjuvant* dan tidak berpengaruh nyata terhadap perkembangan ovarium. Terjadinya perbedaan gambaran histologis diduga adanya kontaminan seperti kontribusi residu karbohidrat pada antigen bZP3 yang diimunisasikan, sehingga perlu dilakukan pemurnian antigen

bZP3 melalui proses deglikosilasi, yaitu penghilangan molekul karbohidrat yang terikat pada rantai polipeptida bZP3 melalui ikatan glikan.

Zona pellusida-3 mempunyai derajat glikosilasinya bervariasi dengan populasi karbohidrat yang sangat heterogen yang terikat pada asam amino sern. treonin atau asparagin (Tulsiani, 2000). Sekuen oligosakanda yang terikat pada glikoprotein berperan dalam mengawali proses fertilisasi. Pada awal tahap fertilisasi spermatozoa mengadakan ikatan dengan rantai karbohidrat dari glikoprotein ZP3 yang bersifat spesies spesifik. Namun dari data penelitian lain menjelaskan bahwa antibodi ZP3 bereaksi sangat lemah dengan ZP3 terdeglikosilasi, tetapi reaktivitas ini dapat ditingkatkan dengan memperbaiki kualitas protein sebagai antigen melalui penyiapan glikoprotein yang terdeglikosilasi (Yurewicz *et al.*, 1993 dan Tulsiani, 2000);

Dalam penelitian ini dilakukan identifikasi peran ikatan glikan pada *native* bZP3 melalui proses deglikosilas enzimatik. Molekul bZP3dG dikarakterisasi terhadap kemampuannya dalam menginduksi respon imun humoral, yang diduga dapat mengganggu pengikatan dengan ligannya pada spermatozoa serta menghambat proses fertilisasi secara *reversible* untuk tujuan jangka panjang pemanfaatan bZP3 sebagai bahan untuk calon imunokontrasepsi

1.2. Rumusan Masalah.

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut:

Apakah antibodi hasil induksi *bZP3* terdeglikosilasi (*bZP3dG*) lebih efektif daripada anti-*bZP3* hasil induksi *bZP3* dalam menghambat fungsi pengikatan reseptor spermatozoa dan proses fertilisasi secara *reversible*.

Dari pokok permasalahan tersebut, dapat dibuat beberapa submasalah seperti tersebut dibawah ini:

- 3.2.1. Apakah hilangnya ikatan glikan pada *bZP3dG* menyebabkan adanya perbedaan karakter biokimiawi dengan *bZP3* ?
- 3.2.2. Apakah hilangnya ikatan glikan pada *bZP3* mempengaruhi profil antibodi hasil induksinya ?
- 3.2.3. Bagaimana mekanisme peran antibodi hasil induksi *bZP3* dan *bZP3dG* dalam penghambatan fungsi pengikatan reseptor spermatozoa ?
- 3.2.4. Apakah antibodi hasil induksi *bZP3dG* berpotensi menghambat proses fertilisasi secara *reversible* lebih efektif dibandingkan dengan antibodi hasil induksi *bZP3* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah: untuk mengkaji peran ikatan glikan pada molekul glikoprotein *bZP3* yang mengalami proses deglikosilasi dalam menginduksi anti-*bZP3dG*, serta mengungkap peran anti-*bZP3dG* terhadap penghambatan fungsi pengikatan reseptor spermatozoa untuk dasar pengembangan imunokontrasepsi.

1.3.2. Tujuan Khusus

1. Untuk memperoleh bukti peran ikatan glikan pada molekul *bZP3* terhadap karakter biokimiawi
2. Untuk memperoleh bukti bahwa pemulusan ikatan glikan pada molekul *bZP3* dapat meningkatkan potensi imunogenik dalam membangkitkan respon imun humoral.
3. Untuk mengkaji peran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* dalam menghambat fungsi pengikatan spermatozoa.
4. Untuk mengkaji peran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* dapat menginduksi penghambatan proses fertilisasi yang bersifat *reversible*.

Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Keilmuan :

- 1 Menjelaskan efek deglikosilasi pada *bZP3* terhadap karakter biokimiawi molekul *bZP3* serta peran pengikatan reseptor spermatozoa.
2. *Bovine ZP-3* yang terdeglikosilasi (*bZP3dG*) merupakan temuan baru yang bersifat imunogenik untuk membangkitkan respon imun humoral dan mampu menghambat proses fertilisasi secara *reversible*

1.4.2. Manfaat Praktis

Bila penelitian ini dapat mengungkap mekanisme dan fungsi antibodi hasil induksi reseptor primer spermatozoa yang mengalami deglikosilasi (*bZP3dG*) untuk dikembangkan sebagai dasar perancangan imunokontrasepsi yang efektif, aman dan *reversible* terkontrol.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Morfologi Dan Organisasi Genomik Zona Pellusida

Pada mamalia, sel telur (ovum) dilindungi oleh suatu selaput yang disebut Zona Pellusida (ZP) yang tersusun atas beberapa jenis glikoprotein pada tiap spesies. Awal interaksi antara sel telur dan spermatozoa pada kelompok mamalia difasilitasi oleh ZP (Osmond, 1996, Franken, 1998, Burkin and Miller, 2000, Wassarman, 2002). Zona pellusida mempunyai beberapa fungsi, satu diantaranya adalah sebagai reseptor spermatozoa (Yonezawa *et al.*, 1999; Tulsiani, 2000) Spermatozoa dalam proses fertilisasi, bertindak sebagai antigen dan di dalam ZP terdapat reseptor yang mengenali spermatozoa, sehingga terjadi ikatan sel telur dengan spermatozoa serta memungkinkan terjadinya fertilisasi (Topfer-Petersen *et al.*, 2000).

Taya *et al* (1995) menyatakan bahwa ZP2 babi (*pZP2*) mempunyai kesamaan sekuen asam amino dengan tikus dan manusia secara berurutan sebesar 54 dan 63 persen. Zona pellusida-3 (ZP3) manusia dan tikus paling banyak memiliki kesamaan asam amino mencapai 77% dan masing-masing memiliki rantai polipeptida 424 asam amino. Zona pellusida-2 (ZP2) tikus dan manusia masing-masing mengandung 713 dan 745 asam amino dan 61 %

diantaranya adalah identik (Rankin *et al.*, 1998). Selanjutnya hasil penelitian Scobie *et al.* (1999) bahwa ZP3 tikus memiliki sekuen asam amino yang dipertahankan dan memiliki kesamaan sekuen asam amino dengan mencit, hamster dan manusia lebih dari 66%. Gen ZP2 dan ZP3 pada manusia dipertahankan sampai 60-70% dan dikenali oleh sekuen asam amino ZP tikus, sedangkan ZP1 tikus hanya 39%. Sekuen asam amino tetap dipertahankan dan dapat dikenali oleh ZP1 manusia (Prasad *et al.*, 2000). Hasil penelitian yang dilaporkan oleh Zhu dan Naz (1999) yaitu ZP3 memiliki tingkat kesamaan urutan asam amino yang tinggi pada beberapa kelas mamalia, bahkan antara babi (*ungulata*) dan kelinci (*lagomorpha*) menunjukkan tingkat kesamaan mencapai 95,4%. Data NCBI (2002) tentang sekuen rantai polipeptida penyusun molekul ZP3 beberapa mamalia diketahui mempunyai "conserved region" yaitu urutan asam amino seperti pada Tabel 2.1. Namun belum semua sekuen asam amino penyusun ZP diketahui diketahuinya, seperti yang ditemukan pada ZP1, ZP2 dan ZP3 (Jovine *et al.*, 2002).

Tabel 2.1 Sekuen Asam Amino Yang Dipertahankan Pada Beberapa Mamalia (NCBI, 2002)

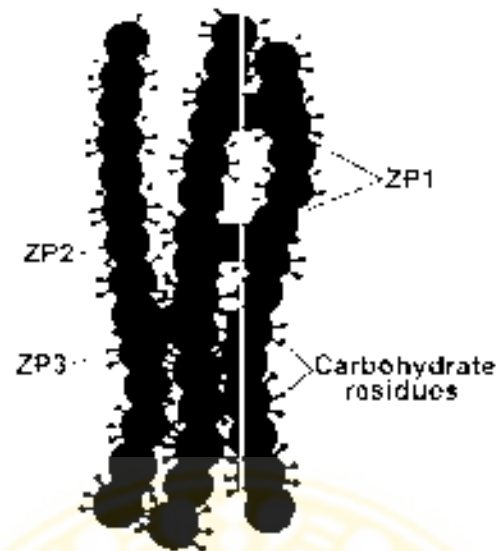
Klas Mamalia	Lokasi dan Sekuen asam amino yang dipertahankan (1)	Lokasi dan Sekuen asam amino yang dipertahankan (2)
Manusia	Piecryprqgnvss (137-150)	Dvtvgplifi (358-367)
Babi	Piechyrqgnvss (136-149)	Dvtvgplifi (355-364)
Sapi	Piechyrqgnvss (136-149)	Dvtvgplifi (355-364)
Tikus	Piecryprqgnvss (136-149)	Dvtvgplifi (360-369)
Kelinci	Piechyrqgnvss (134-144)	Dvtvgplifi (350-359)

Wassarman (1999) telah mempelajari organisasi molekuler dari matrik zona pellusida, dan berdasarkan mobilitas elektroforetik dari glikoprotein ini dikelompokkan dalam ZP1 tikus (*mZP1*) yang merupakan dimer mempunyai berat molekul (200 kDa), *mZP2* (120 kDa) dan *mZP3* (83 kDa). Selanjutnya oleh peneliti lain, ZP pada babi dapat dipisahkan 4 molekul glikoprotein, *pZP*, *pZP2*, *pZP3* dan *pZP4*, dengan berat molekul berturut-turut adalah 92.000, 69.000, 55.000 dan 23.000 Dalton (Hirsch *et al.*, 1999). Kudo *et al.* (1999) melaporkan bahwa ZP pada babi terdiri dari ZPA, ZPB dan ZPC, dimana pada ZPC dibedakan menjadi ZP3- α dan ZP3- β . ZP3- β dari oleh peneliti lain disebut *pZP3- β* mempunyai persamaan sekuen asam amino dengan *mZP3* (mouse-ZP3). Glikoprotein-ZP pada menciit terdiri dari 3 molekul glikoprotein yaitu *mZP1*, *mZP2* dan *mZP3*, demikian juga pada tikus dengan menggunakan metode

SDS-PAGE dapat dipisahkan menjadi 3 jenis yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3 (Jakson *et al.*, 1998)

Hasil penelitian yang dilakukan Aulanni'am, dkk. (2001) telah berhasil memisahkan 4 molekul zona pellusida sapi, yang diberi nama *bZP1*, *bZP2*, *bZP3* dan *bZP4*. Adanya ikatan glikan pada molekul *bZP3* dilaporkan oleh Sumitro dan Aulanni'am (2000) melalui metode reaksi *Periodic acid -Schiff-Reaction* * (PAS-Reaction). Perbandingan mol protein antara ZP2 dan ZP3 mendekati perbandingan rasio 1:1, dimana jumlah mol ZP1 adalah 0,9 % dari jumlah mol ZP2 dan ZP3 (Green, 1997). Selanjutnya Mcleskey *et al.* (1998) melaporkan bahwa glikoprotein ZP3 mencit mempunyai berat molekul 83 kDa terdiri dari rantai peptida dengan berat molekul 44 kDa dan terdapat tiga atau empat molekul oligosakarida yang terikat melalui *N-linked* dan sejumlah *O-linked oligosaccharide* yang belum dapat ditentukan.

Gambaran struktur molekul glikoprotein ZP yang berbentuk filamen seperti pada Gambar 2 :



Gambar 2.1 Struktur Glikoprotein Zona Pellusida Yang Berbentuk Filamen (Gronn 1997)

Gambar 2.1 menunjukkan adanya gambaran molekul ZP2 dan ZP3 membentuk filamen heterodimer. ZP2 dan ZP3 ini berikatan membentuk ulangan heterodimer dengan perbandingan 1:1. ZP1 terdiri atas dua polipeptida yang dihubungkan oleh ikatan disulfida, menghubungkan filamen filamen ZP2 dan ZP3, serta mempunyai fungsi menjaga integritas ZP.

Zona Pellusida berperan dalam proses pengenalan gamet (*gametic recognition*), aktivasi spermatozoa dan pencegahan terhadap polispermi. Pengenalan gamet ini dapat menginduksi suatu sinyal transduksi yang menghasilkan suatu reaksi akrosom, eksositosis dan terjadi penetrasi terhadap ZP dan selanjutnya terjadi fusi dengan selaput vitelin dari oosit (Kerr *et al* 1998, Shirakawa and Miyazaki 1999, Haila and Tulsiani, 2000).

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

2.2. Biosintesis Zona Pellusida

Zona Pellusida yang merupakan matrik ekstraseluler dari sel telur disintesis selama perkembangan folikular serta menyelimuti membran plasma sel telur, namun sampai saat ini mekanisme sintesis dan sekresi serta penggabungan dari molekul glikoprotein ZP masih belum seluruhnya terungkap, dan sudah dipelajari melalui penggunaan antibodi terhadap ZP1, ZP2 dan ZP3 dari tikus (El-Mestrah *et al.*, 2002; Kiefer and Seling, 2002). Namun sampai saat ini oleh beberapa peneliti masih dikenal ada 3 teori yang diusulkan tentang terjadinya sintesis glikoprotein ZP yaitu, (1) hanya oleh peran oosit, (2) hanya oleh sel folikel dan (3) oleh peran keduanya yaitu oleh oosit dan sel folikel (Kimura *et al.*, 1994 dan Epifano *et al.*, 1995). Teori pertama menerangkan bahwa ZP disintesis dan disekresi oleh oosit yang sedang tumbuh selama 2–3 minggu periode perkembangan. Meningkatnya diameter oosit diikuti dengan meningkatnya ketebalan ZP. Ketebalan ZP dapat mencapai ~ 7 μm mengelilingi oosit tikus yang sedang berkembang penuh (diameter oosit 80 μm) (Wassarman *et al.*, 1996). Selanjutnya teori yang ke-3 oleh beberapa peneliti diyakini bahwa pada beberapa spesies mamalia sintesis glikoprotein ZP terjadi oleh peran oosit dan sel folikel (Dunbar *et al.*, 1994, Sinowatz *et al.*, 1995 and Grootenhuis *et al.*, 1996). Pada penelitian Totzauer *et al.* (1998) meyakini bahwa

foetus sapi baik ovarium maupun sel folikelnya berperan pada sintesis ZP selama pertumbuhan *pre* dan *post natal*.

Pada fase profase-I dari perkembangan oosit manusia dapat teridentifikasi glikoprotein ZP3 dan ZP2 dengan berat molekul berturut-turut adalah 53-60 kDa dan 90 – 110 kDa. Selanjutnya pada fase metaphase II tidak tampak adanya modifikasi dari ZP3, tetapi pada ZP2 mengalami proteolisis terbatas pada domain asam amino sampai dihasilkan ZP2 dengan berat molekul menjadi 60 -73 kDa. ZP2 yang spesifik terhadap protease ini dilepaskan selama terjadi eksositosis dari granula kortikal yang terjadi selama fase meiosis pada tahap maturasi sampai terjadinya fusi dengan spermatozoa sebagai langkah memblokir polispermi. Dengan menggunakan metode non radioaktif pada *in situ* hibridisasi, dijelaskan bahwa mRNA yang mengkode glikoprotein ZP3 ditemukan pada ovarium, oosit dan embrio. Pada ovarium distribusi mRNA berkorelasi dengan tahap perkembangan folikel. Sedangkan pada folikel primordial dan folikel primer, mRNA sangat dominan pada oosit, yaitu ditemukan pada oosit juga pada folikel sekunder dan tersier. Pada embrio umur 2 hari yang dihasilkan melalui fertilisasi *in vitro*, tidak ditemukan mRNA yang mengkode ZP3. Namun melalui metode *immunoblotting* menggunakan antibodi poliklonal monospesifik terhadap ZP3 babi nampak pita yang jelas pada berat molekul 47 kDa pada preparat korteks ovarium sapi, anak sapi dan fetus sapi sebaik pada sel folikel.

Selama periode perkembangan folikular ZP disintesis oleh oosit sejak dari folikel primer sampai folikel sekunder dan tersier dan setelah fertilisasi sintesis ZP ini berakhir (Evan, 2000; Zhao and Dean, 2002)

Protein ZP antara lain berperan dalam komunikasi sel antara oosit dan sel folikel selama oogenesis, melindungi perkembangan oosit dan embrio, serta mengatur proses fertilisasi (Wassarman *et al.*, 1999). Perubahan struktur konformasi protein ZP dapat menyebabkan terganggunya fungsi salah satu protein, dan hal ini diduga berpengaruh terhadap folikulogenesis dan fertilisasi (Rankin *et al.*, 1999; Wassarman *et al.*, 1999). Namun hal ini kemungkinan disebabkan oleh imunisasi menggunakan *crude* ZP yang mengandung berbagai macam ZP yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3 (Wassarman *et al.*, 1999)

2.3. Imunogenisitas Dari Zona Pellusida

Zona Pellusida berperan dalam proses pengenalan gamet (*gametic recognition*), aktivasi spermatozoa dan pencegahan terhadap polispermi, sehingga glikoprotein yang menyelimuti oosit merupakan target imunokontraspsi (Barber *et al.*, 2002; Wassarman 2002, Paterson *et al.*, 2002). Mencit yang mendapat imunisasi isolat glikoprotein ZP dari babi (*pZP*) dapat menginduksi titer antisera yang tinggi. Semua antisera kecuali anti-*pZP*2

menunjukkan interspesifik reaksi silang dengan manusia, kelinci dan hamster ZP, selanjutnya penambahan antisera terhadap pZP1, pZP3 dan pZP4 menunjukkan penghambatan yang kuat terhadap pengikatan dengan spermatozoa manusia dan penetrasi kedalam ZP manusia (Hasegawa and Koyama, 1996).

Zona pelusida-3 telah dipakai sebagai imunogen pada imunisasi aktif dan mampu menghambat interaksi spermatozoa dengan sel telur pada fertilisasi *in vitro*. Antibodi hasil induksi oleh ZP3 ini mampu menekan lebih dari 60 % proses *binding* antara spermatozoa dan sel telur manusia. Selanjutnya pada studi *in vivo* mampu menginduksi titer antibodi yang tinggi dan tidak ditemukan adanya kerusakan fungsi ovarium (Paterson *et al.*, 2002).

Terikatnya spermatozoa pada ZP terjadi melalui interaksi spesifik yang merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Plasma spermatozoa mengandung molekul yang diperlukan untuk interaksi dengan ZP, dimana molekul ZP3 digambarkan sebagai reseptor untuk terjadinya reaksi akrosom (Hinsch *et al.*, 1999). Mencit mutan yang tidak mempunyai ZP3 meskipun dikawinkan dengan jantan fertil tetap steril (Rankin *et al.*, 1998; Rankin and Dean, 1996). Zona pelusida-3 pada beberapa spesies berperan untuk merangsang terjadinya reaksi akrosom spermatozoa, yang merupakan prasarat untuk terjadinya fertilisasi melalui pelepasan enzim hidrolitik (Breitbart and Spungin, 1997). Pada proses reaksi akrosom terjadi

proses eksositosis dari kortico granulosa pada membran spermatozoa yang mengandung senyawa kimia (seperti *protease*) yang mempunyai peran penting untuk menembus ZP. Terjadinya reaksi akrosom tidak lepas dari peran ZP3, dan apabila terjadi hambatan terhadap interaksi ini maka fertilisasi tidak akan terjadi.

2.4. Komposisi Karbohidrat Dalam Glikoprotein Zona Pellusida

Ikatan glikoprotein membentuk bagian struktur membran, sehingga dapat mempengaruhi lipid dari membran. Glikoprotein pada membran mempunyai satu atau lebih bagian dari rangkaian peptida, yang didominasi oleh asam amino hidropobik, sehingga pada bagian ini terjadi hubungan dengan lapisan lipid dari membran. Hampir semua protein pada permukaan sebelah luar sel hewan adalah glikoprotein (Lehninger, 1995). Menurut Aviles *et al.* (1997) dan Franken (1998) bahwa glikoprotein ZP mempunyai persamaan fungsi yang sangat penting selama berlangsungnya proses fertilisasi diantara klas mamalia.

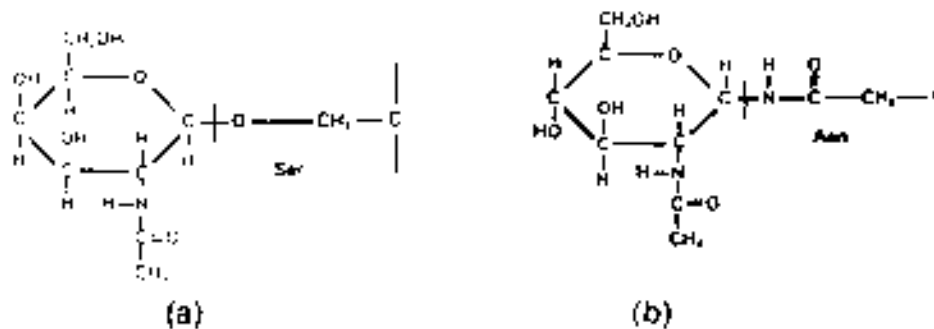
Keberadaan karbohidrat cenderung membuat glikoprotein lebih larut dalam air karena sifat dari karbohidrat yang hidrofilik. Zera dan Naz (1998), Sinowatz *et al.* (1998); Haila dan Iuliani (2000) menyatakan bahwa karbohidrat pada molekul glikoprotein ZP mempunyai peran dalam interaksi primer yang terjadi antara spermatozoa dan sel telur pada beberapa spesies yang berbeda.

Sekuen oligosakarida yang terikat pada glikoprotein ikut berperan dalam menginisiasi proses fertilisasi. Hasil penelitian Loeser *et al.* (1999) menunjukkan bahwa sejumlah spermatozoa secara signifikan mengalami rekasi akrosom lebih besar dengan adanya *mannose-BSA*, *N-acetylglucosamine-BSA* dan *N-Acetylgalctosamine-BSA*, daripada tanpa adanya mereka. Karbohidrat yang terkandung pada glikoprotein pada keadaan tertentu menentukan spesifisitas dari glikoprotein

Glikoprotein adalah protein yang mempunyai rantai kovalen oligosakarida (glikan) yang berikatan kovalen pada " *polypeptide backbones* " penyusun glikoprotein. Hal ini menunjukkan bahwa suatu glikoprotein adalah suatu molekul yang terdiri dari satu atau lebih rantai kovalen karbohidrat yang berikatan dengan protein (Green, 1997). Sakarida terikat pada rantai polipeptida melalui dua jenis ikatan yang disebut " *O-linked saccharide* " dan " *N-Linked Saccharide* ". *O-linked saccharide* terjadi pada asam amino serin (Ser) dan treonin (Thr), sedangkan ikatan *N-linked saccharide* terjadi pada asam amino asparagin (Asn) (Reginald & Charles, 1996; Barber *et al.* (2000); Dunbar *et al.*, 2001).

N-linked saccharide terjadi melalui ikatan β -GlcNAc-Asn, dimana Asn terdapat pada urutan Asn-X-Ser/Thr atau Asn-X-Cys. Pada umumnya *N-linked saccharide* ini mempunyai cabang manosa dengan inti GlcNAc. Hasil deglikosilasi secara enzimatik akan

didapatkan N- dan O-sakarida (Barber *et al.*, 2000)



Gambar 2.2. (a) *O-Linked Saccharide* . (b) *N-Linked Saccharide*
(Reginald & Charles, 1996)

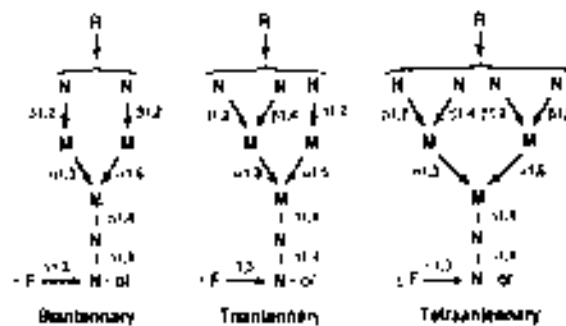
Molekul karbohidrat menambah besarnya molekul glikoprotein, dengan bertambahnya jumlah *glikosaminoglikan*. Kompleks molekul yang merupakan ikatan antara karbohidrat dengan protein ini mempunyai peran penting dalam interaksi spermatozoa dengan ZP pada beberapa spesies. Namun oligosakarida dari molekul ZP3 yang berinteraksi dengan spermatozoa sampai sekarang belum teridentifikasi, namun dengan melepas atau memblokir *N-acetylglucosamine* dalam residu ZP3 dapat memblokir pengikatan dengan spermatozoa (Nakano and Yonezawa 2001, Miler *et al.*, 2002)

Hasil penelitian yang dilakukan Loeser *et al.* (1999) menunjukkan adanya residu gula yang berikatan kovalen pada rantai protein ZP3 tikus (*mZP3*) mampu menginduksi reaksi

akrosom pada spermatozoa tikus yang terkapasitasi. Selanjutnya dijelaskan oleh Loeser *et al* (1999) bahwa residu karbohidrat pada mZP3 diduga dikenali oleh enzim *glycosidase (galactosyltransferase)* melalui penelitian uji neoglycoprotein dalam menginduksi reaksi akrosom. *Neoglycoprotein (NGPS)* adalah glikoprotein sintetis dengan suatu monosakarida yang diketahui dapat berkonjugasi dengan BSA.

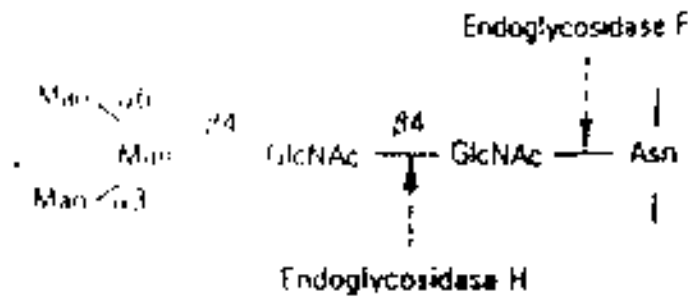
2.5. Deglikosilasi Pada Molekul Glikoprotein Zona Pellusida

Deglikosilasi adalah suatu proses pemutusan rantai karbohidrat yang terikat pada rantai karbon polipeptida dalam molekul glikoprotein. Karbohidrat yang terkandung dalam molekul ZP diduga mempunyai peran dalam interaksi antara spermatozoa dan sel telur, karena banyaknya enzim yang dikeluarkan oleh spermatozoa saat reaksi akrosom dan akan bereaksi dengan substrat yang ditemui di sekitar sel telur, sehingga selanjutnya dapat menembus rangkaian polipeptida dari molekul glikoprotein ZP3 untuk mengawali proses fertilisasi (Aviles *et al*, 1997). Rangkaian karbohidrat yang terikat pada molekul ZP3 dihipotesakan sebagai bentuk *biantennary*, *triantennary* ataupun *tetraantennary* terutama melalui ikatan *N-glycosaccharide*, seperti terlihat pada Gambar 2.3 (Tulsiani, 2000)



Gambar 2.3. Hipotesa Struktur Molekul Glikan Pada ZP3 Tikus (Tulsiani, 2000)

Pemulusan molekul ini dapat dilakukan secara non enzimatis dan enzimatis (Yonezawa *et al.*, 1999). Selama ini deglikosilasi pada molekul glikoprotein secara non enzimatis dilakukan menggunakan TFMS (*trifluoro methanesulfonic acid*) dan anisol serta secara enzimatis menggunakan enzim *glycanase* atau *endo/exo-glycohidrolase*. Hasil deglikosilasi terhadap total molekul ZP dapat dipisahkan menjadi 66 kDa, 52 kDa, 32 kDa dan 32 kDa, yang secara berturut-turut diberi nama yaitu pZP , $pZP2$, $pZP3-\alpha$ dan $pZP3-\beta$ (Hasegawa & Koyama, 1996 dan Topfer-Petersen *et al.*, 2000).



Gambar 2.4. Hidrolisis Molekul Glikan Yang Terikat Pada Asparagin (Asn) Dalam Rantai polipeptida (Barber *et al.*, 2000).

Beberapa peneliti setuju bahwa interaksi spermatozoa dan sel telur difasilitasi oleh karbohidrat yang mentrigger suatu jalur signal transduksi yang berakibat penetrasi dan fusi dari membran plasma spermatozoa serta membran luar akrosom (Tulsiani, 2000). Bukti adanya beberapa molekul *putative sugar-binding* pada membran plasma spermatozoa menunjukkan bahwa beberapa interaksi reseptor ligan harus terjadi sebelum interaksi spermatozoa dan sel telur. Hasil penelitian yang dilakukan Tulsiani (2000) menunjukkan bahwa interaksi pertama antara spermatozoa dan zona pellusida merupakan suatu proses binding yang kompleks yang mencerminkan interaksi antara protein permukaan spermatozoa dan zona pellusida. Hal ini berarti bahwa reseptor protein spermatozoa pada ZP tertutup oleh suatu molekul karbohidrat yang kompleks, dimana molekul ini harus terlepas atau terhidrolisis lebih dulu oleh enzim yang dihasilkan pada tudung spermatozoa agar

spermatozoa mencapai rantai protein yang merupakan reseptornya yaitu molekul protein dari ZP3.



Gambar 2.5. Ilustrasi ZP3 Sebagai Reseptor Spermatozoa Berikatan Dengan *Galatase-I* Pada Permukaan Akrosom Spermatozoa (Miller, 1999).

Gambar 2.5 menunjukkan bahwa ZP3 mempunyai fungsi dalam menginduksi reaksi akrosom. Dari Gambar 2.5 ini dapat dijelaskan bahwa *Galatase-I* (β 1,4-galactosyltransferase/*GalT-1*) pada permukaan spermatozoa hanya dapat berikatan dengan molekul ZP3, tidak pada molekul ZP yang lain, meskipun tiga molekul ZP yang lain juga mempunyai residu *N-acetylglucosamine*. Hal ini artinya bahwa *GalT-1* hanya berikatan pada residu *N-acetylglucosamine* yang spesifik. Enzim β 1,4-galactosyltransferase mempunyai beberapa fungsi yaitu, (1) protein multifungsi, (2) reseptor pengikat dan (3) mengaktifkan transduksi signal dan reaksi akrosom. Selanjutnya dilaporkan antibodi

terhadap GalT-1 dapat menghambat ikatan spermatozoa dengan ZP3 yang akhirnya menghambat ikatan spermatozoa dengan sel telur. Namun data penelitian pada spermatozoa tikus yang sudah mengalami delesi pada GalT-1 masih mampu berikatan dengan ZP tetapi tidak mampu menginduksi reaksi akrosom. Sampai saat ini peran GalT-1 yang jelas adalah berkaitan dengan *signal transduction* yaitu (1) GalT-1 membentuk suatu kompleks dengan *heterodimeric G Protein* dan mengaktifkan signal dan menyebabkan eksositosis spermatozoa dan (2) GalT-1 mengaktifkan reseptor *proteine kinase* untuk terjadinya reaksi akrosom (Loeser *et al.*, 1999).

2.6. Fertlisasi

Fertilisasi adalah proses penggabungan 2 gamet untuk menghasilkan individu baru yang diawali dengan pengenalan gamet yang bersifat spesifik spesies. Proses ini berlangsung beberapa tahap dengan multi komponen yang terlibat, yaitu antara glikoprotein ZP dan reseptor permukaan spermatozoa (Gosh and Datta, 2003; Talbot *et al.*, 2003). *D-mannosylated glycoproteins* merupakan komposisi terbanyak dari ZP kerbau merupakan ligan untuk pengikatan pada permukaan spermatozoa yang diberi nama *hyaluronan binding protein (HABP1)* (Gosh and Datta, 2003). Hal ini sejalan dengan pendapat Aitken (1995) bahwa adanya molekul

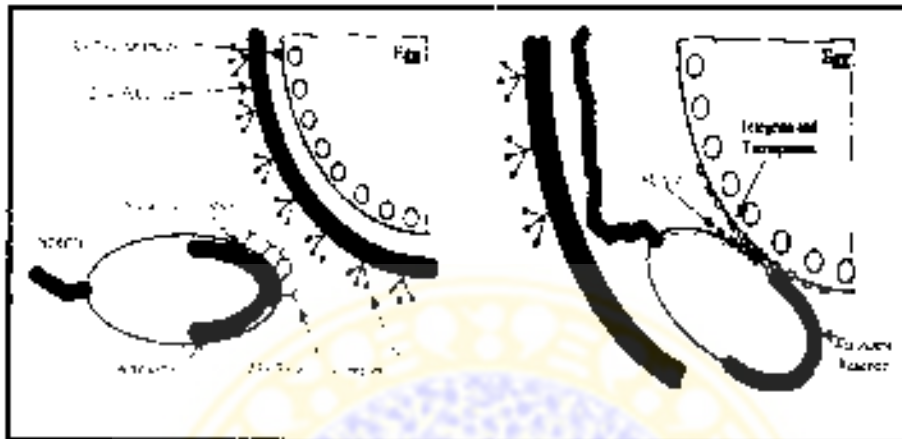
komplementer (*specific sperm binding protein*) mutlak diperlukan untuk keberhasilan fertilisasi (Aitken, 1995)

Proses fertilisasi terdiri dari 4 tahap yaitu, (1) kontak dan pengenalan antara spermatozoa dan sel telur, (2) regulasi masuknya spermatozoa ke dalam sel telur, (3) fusi materi genetik spermatozoa dan sel telur serta (4) aktivasi metabolisme zigot untuk mengawali perkembangan.

Proses fertilisasi yang diawali dengan pengenalan spermatozoa dengan sel telur segera diikuti dengan terikatnya spermatozoa pada ZP. Selanjutnya diikuti induksi reaksi akrosom dengan dibebaskannya enzim protease pada granula korteks yang terlibat dalam modifikasi molekul ZP. Peristiwa ini yang menyebabkan terjadinya perubahan aktivitas biologis ZP, namun perubahan ini tidak terdeteksi melalui elektroforesis dua dimensi (Wassarman, 1998). Peristiwa ini mempunyai beberapa fungsi penting yaitu sebagai sarana interaksi gamet yang bersifat spesifik spesies, mencegah polispermi dan melindungi embrio pada saat implantasi

Proses fertilisasi yang merupakan interaksi 2 gamet merupakan suatu contoh dari proses seluler yang melibatkan sel adhesi spesifik, sel signaling, regulasi eksositosis, migrasi sel, penggabungan sel dan regulasi dari siklus sel (Miller et al., 2002)

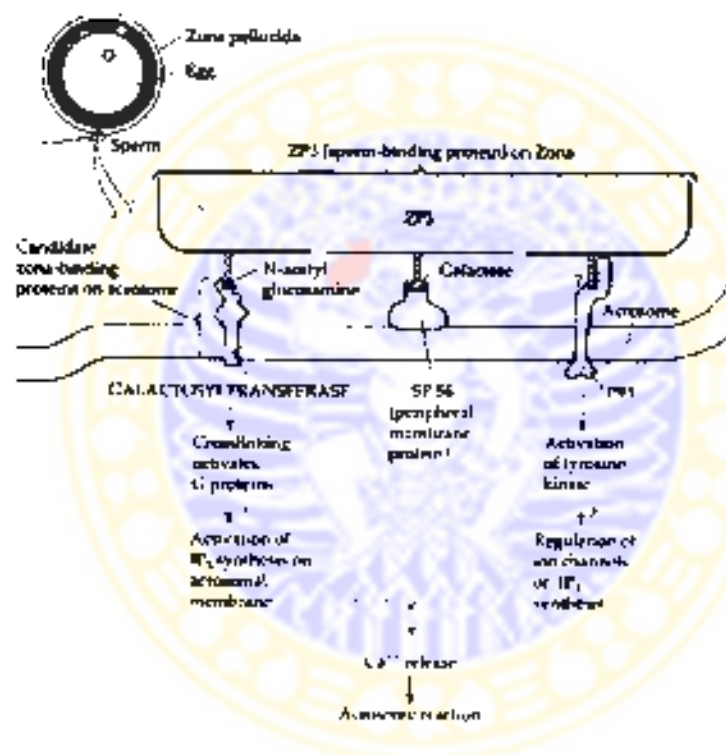
Skema model fertilisasi dijelaskan oleh Miller *et al.*, (2002) seperti pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Skema Model Proses Fertilisasi (Miller *et al.*, 2002)

Gambar 2.6 menggambarkan spermatozoa terkaapasitas mengikat ZP3 melalui suatu reseptor yang kompleks, seperti GalT-1. Pengikatan pada GalT1 mengaktifkan rangkaian proses induksi reaksi akrosom untuk selanjutnya akan menembus ZP, terjadi fusi dengan membran plasma oosit melalui famili ADAM pada spermatozoa dan berinteraksi dengan kompleks *integrin-transferin* pada sel telur. Gabungan ini akan mengaktifkan oosit untuk melepaskan granula kortek untuk melakukan modifikasi molekul ZP agar tidak dapat mengikat spermatozoa (Miller *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2003). Rangkaian proses ini juga dijelaskan oleh Wassarman *et al.* (2001) untuk menggambarkan profil fertilisasi pada mamalia.

dengan menggunakan tikus sebagai model yang terjadi melalui 5 tahap yaitu. (1) Pengikatan secara spesifik spesies antara spermatozoa dan sel telur, (2) peran $mZP3$, Ca^{2+} , G protein dan reaksi akrosom, (3) penetrasi ZP oleh spermatozoa, (4) peran ADAM, integrin dan interaksi spermatozoa dengan sel telur, (5) fusi spermatozoa dengan sel telur.



Gambar 2.7 Interaksi Protein ZP3 Dengan Ligannya Pada Membran Spermatozoa (Snell and White, 1996)

Gambar 2.7. menjelaskan bagaimana ZP berkemampuan melekat dan berinteraksi dengan spermatozoa. Secara jelas nampak bahwa protein ZP3 berperan penting untuk mengawali

proses fertilisasi melalui pengikatan pada beberapa reseptor spermatozoa yaitu *galactosyltransferase*, *sp56* dan *P95* (*zrk*). *Galactosyltransferase* merupakan suatu enzim yang berperan sangat penting untuk pengikatan dengan ZP, dimana enzim ini mengenali *N-acetylglucosamine* dari ZP3. *Sp56* adalah protein yang secara spesifik mengikat pada residu galaktosa pada ZP3. Selanjutnya reseptor ke- tiga yaitu *zrk* adalah suatu enzim yang mempunyai berat molekul sebesar 95 kDa dan merupakan protein transmembran yang mempunyai 2 fungsi pengikatan pada sisi ekstra dan intraseluler. Sisi ekstraseluler secara spesifik mengikat ZP3, sedangkan pada sisi intraseluler mempunyai aktivitas *tyrosin kinase*. Sehingga dapat dijelaskan bahwa protein 95 kDa merupakan reseptor *tyrosin kinase* yang mengawali terjadinya reaksi akrosom melalui proses fosforilasi pada target proteinnya. Gambar 2.7 ini juga dapat menjelaskan kemungkinan terjadinya hambatan terhadap pengikatan spermatozoa dengan ZP3 melalui penghambatan oleh enzim maupun oleh antibodi terhadap ke tiga reseptor tersebut

2.7. Peran Zona Pellusida 3 Dalam Proses Fertilisasi

Zona pelusida mamalia adalah matriks ekstraseluler yang mengelilingi oosit dan struktur ZP tetap bertahan selama ovulasi, fertilisasi, dan awal perkembangan embrio preimplantasi. Zona

pellusida berfungsi sebagai pelindung ovum yang baru diovulasikan dan sebagai struktur proteksi bagi perkembangan embrio setelah fertilisasi.

Fertilisasi adalah proses penggabungan 2 gamet untuk menghasilkan individu baru yang diawali dengan pengenalan gamet yang bersifat spesies spesifik. Proses ini berlangsung karena adanya molekul komplementer (*Specific sperm binding protein*) yang mutlak diperlukan untuk keberhasilan fertilisasi. Ada 4 tahap utama dalam proses fertilisasi, yaitu kontak dan pengenalan antara spermatozoa dengan sel telur, regulasi masuknya spermatozoa ke dalam sel telur, fusi materi genetik spermatozoa dengan sel telur dan aktivasi metabolisme zigot untuk mengawali perkembangan (Gilbert, 1997).

Proses fertilisasi yang diawali dengan kontak dan pengenalan spermatozoa dengan sel telur. Proses ini segera diikuti dengan proses terikatnya spermatozoa pada ZP. Selanjutnya diikuti induksi reaksi akrosom dengan dibebaskannya enzim *protease* pada granula korteks yang terlibat dalam proses modifikasi molekul ZP (Aviles *et al.*, 1996).

Zona pellusida-3 pada beberapa spesies terbukti menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa, yang merupakan suatu proses mutlak untuk terjadinya fertilisasi (Bauskin *et al.*, 1999). Tenkatnya spermatozoa pada ZP adalah interaksi spesifik yang merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Proses fertilisasi pada

mamalia sangat kompleks, dimulai dengan transpor sel gamet dalam saluran reproduksi sampai berakhir pada fusi membran spermatozoa dan sel telur (Talbot *et al.*, 2003). Hal lain yaitu bahwa spermatozoa harus melewati sel kumulus, melekat pada ZP3 dan memulai reaksi akrosom untuk dapat menembus ZP. Setelah penembusan ZP, maka spermatozoa berada dalam ruang perivitelin dan menempel pada membran vitelin. Plasma spermatozoa mengandung molekul yang diperlukan untuk interaksi dengan ZP. Molekul ZP3 digambarkan sebagai ligan dan sebaliknya protein plasma membran disebut sebagai reseptor untuk terjadinya reaksi akrosom (Hinsch *et al.*, 1999).

Interaksi spermatozoa dan sel telur terjadi melalui beberapa fase pada permukaan sel telur, yang diawali dengan perlekatan pada matrik ekstraseluler dan selanjutnya pada plasma membran sel telur (Evan, 2000; Burkin and Muller, 2000). Pada rangkaian proses interaksi tersebut zona pellusida, suatu matrik ekstraseluler pada sel telur memegang peranan sangat penting. Proses *binding* ZP pada spermatozoa melibatkan reseptor, baik yang ada pada oosit maupun spermatozoa (Talbot *et al.*, 2003). Menurut Morales dan Lanos, 1996 (1992) spermatozoa tikus memiliki protein reseptor yang khusus untuk mengikat ZP, yaitu reseptor pada permukaan spermatozoa, yaitu *galactosyl transferase*, *D-manosidase*, protein *tirosin kinase* dan lektin. Reseptor spermatozoa tikus memiliki berat

molekul 95 kDa yang diidentifikasi sebagai *protein tirosin kinase* (PTK) yang merupakan ligan dari ZP3.

Morales and Lanos (1996) dan Tutsiani (2000) berpendapat bahwa ZP3 bertanggung jawab terhadap *binding* pada spermatozoa, serta ikut berperan sebagai induser terjadinya reaksi akrosom. Dua jenis dari 4 molekul glikoprotein yang berperan dalam proses fertilisasi, yaitu ZP2 berperan sebagai reseptor sekunder spermatozoa dan ZP3 berperan sebagai reseptor primer (Bauskin *et al.*, 1999).

Zona pellusida-3 dan beberapa spesies terbukti menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa yang merupakan suatu proses mutlak untuk terjadinya fertilisasi (Saling and Carbaliada, 1996; Bauskin *et al.*, 1999; Shirakawa and Miyazaki, 1999; Bastiaan *et al.*, 2002; Schuffner *et al.*, 2002; Talbot *et al.*, 2003). Tingkatnya spermatozoa pada ZP adalah interaksi spesifik yang merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Beberapa peneliti melakukan studi tentang kemampuan ZP menginduksi reaksi akrosom, yang selanjutnya dikembangkan untuk investigasi infertilitas pada pria dan memprediksi kegagalan fertilisasi pada pasien yang melakukan fertilisasi *in vitro* (Bastiaan *et al.*, 2002, Esterhuizen *et al.*, 2001^a, Esterhuizen *et al.*, 2001^b).

Spermatozoa harus mengalami reaksi akrosom sebelum menyentuh membran plasma sel telur pada saat fertilisasi. Akrosom

merupakan struktur seperti lisosom yang terdapat pada bagian anterior kepala spermatozoa (Rankin *et al.*, 1998) dan berfungsi sebagai vesikel sekretori membran kepala spermatozoa di berbagai spesies hewan, termasuk semua klas mamalia. Pelepasan isi vesikel terjadi melalui proses eksositosis yang dikenal sebagai reaksi akrosom yang melibatkan fusi antara membran plasma dan membran akrosom luar spermatozoa dan pelepasan enzim-enzim yang terdapat pada membran akrosom, diantaranya *hyaluronidase* dan akrosin. Proses tersebut harus lengkap, sehingga spermatozoa mampu berikatan dengan sel telur pada akhir proses fertilisasi, termasuk fusi gamet (Shirakawa dan Miyazaki, 1999).

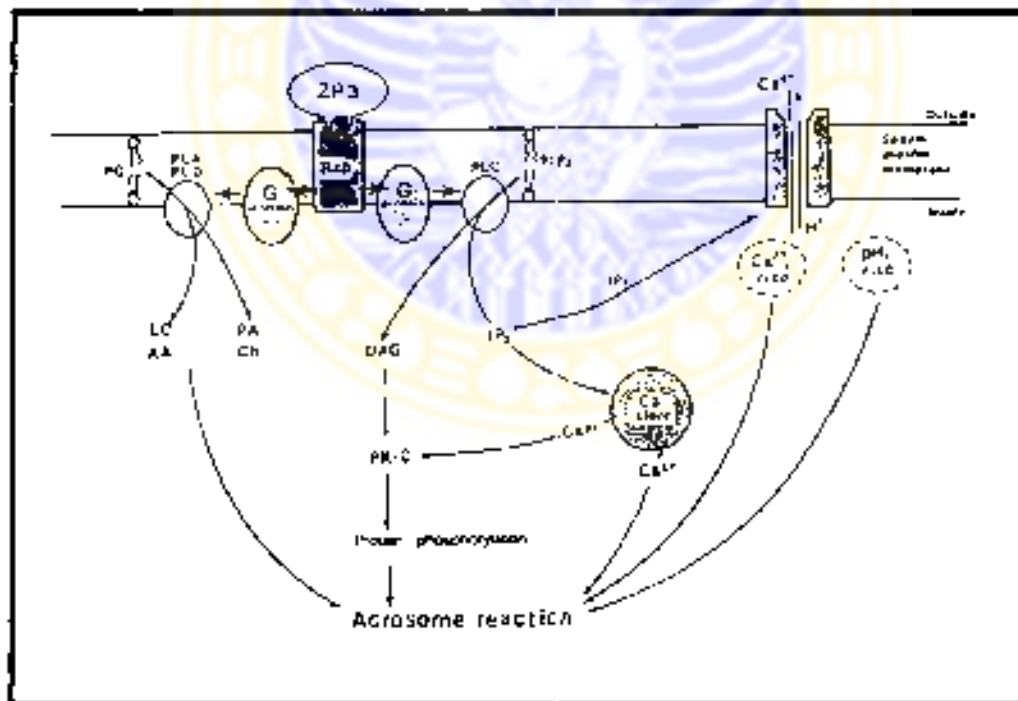
Reaksi akrosom pada spermatozoa mamalia secara *in vitro* distimulasi oleh pengikatan matriks ekstraseluler sel telur yaitu ZP. Studi *in vitro* menunjukkan bahwa ZP3 terlarut, merupakan salah satu dari glikoprotein utama dalam ZP, dapat menginduksi reaksi akrosom spermatozoa mamalia (Shirakawa dan Miyazaki, 1999). Hasil penelitian yang dilakukan Rachmawati (2002) menunjukkan bahwa konsentrasi 7,5 μ L bZP3 selama 45 menit mampu menginduksi reaksi akrosom spermatozoa kambing sebesar 99,44 % dan sapi sebesar 100 % melalui percobaan *in vitro*. ZP3 dapat merangsang terjadinya reaksi akrosom dengan agregasi reseptor membran kepala spermatozoa. Inkubasi spermatozoa dengan *fragment* ZP3 memicu terjadinya kapasitasi pada spermatozoa tikus.

Hal ini dikarenakan ZP3 merangsang reaksi akrosom melalui *crosslinking* reseptornya (Leyton and Saling, 1989).

O'Toole *et al.*, (2000) berpendapat bahwa reaksi akrosom terjadi sebesar 89% (109 dari 122 spermatozoa tikus) menunjukkan respon Ca^{2+} dan dideteksi pada $9,2 \pm 4,1$ menit (dengan kisaran 5,7–24,4 menit) setelah penambahan ZP3. Yanagimachi (1994) menyatakan bahwa untuk menjalani reaksi akrosom pada waktu dan tempat yang tepat, spermatozoa harus mampu bertahan cukup lama, dimana konsentrasi K^+ intraseluler dijaga tetap tinggi dan konsentrasi Na^+ dan Ca^{2+} intraseluler dijaga tetap rendah yang sangat penting bagi kelangsungan hidup spermatozoa, selain itu juga berfungsi sebagai perlindungan dari reaksi akrosom prematur bagi spermatozoa, keadaan ini diatur oleh ikatan $Na^+-K-ATPase$ (memompa ion Na^+ keluar dan ion K^+ masuk kedalam sel) dan $Ca^{2+}-K-ATPase$ (memompa Ca^{2+} keluar dari sel).

Gambar 2.8 menjelaskan adanya hipotesa peran zona pellusida dalam menginduksi reaksi akrosom. Yanagimachi (1994); Bastian *et al.*, (1999); Puruhit *et al.* (1999); Shirakawa dan Miyazaki (1999). Baker *et al.* (2002) menyatakan bahwa reaksi akrosom terjadi setelah perlekatan antara spermatozoa dan sel telur dengan adanya peran zona pellusida-3 (ZP3). Selanjutnya Yanagimachi (1994); Breitbart and Spungin (1997) Shirakawa and Miyazaki (1999) serta Schuffner *et al.* (2002) meyakini bahwa sedikitnya ZP berikatan

dengan plasma membran spermatozoa pada dua reseptor yang berbeda. Satu reseptor (R) adalah *Gi-coupled receptor* yang mengaktifkan enzim *phospholipase C (PLC)* beta 1, dan reseptor yang lain adalah reseptor *tyrosin kinase (TK)* yang terikat pada *PLC gamma*. Pengikatan pada reseptor ini meregulasi *adenylat cyclase (AC)* untuk meningkatkan produksi *cAMP* (siklik AMP) dan mengaktifasi *protein kinase A (PKA)*. PKA akan mengaktifasi *channel volatge-dependent Ca²⁺* pada membran bagian luar dengan melepaskan *Ca²⁺* dari dalam akrosom menuju ke sitosol yang menyebabkan teraktifkannya *PLC*.



Gambar 2.8 . Jalur Induksi Zona Pelusida pada Reaksi Akrosom (Yanagimachi, 1994)

Phospholipase C memecah *Phosphatidilinositol diphosphate* (PIP) menjadi *diacylglycerol* (DAG) dan *Inositol triphosphate* (IP₃). IP₃ akan meningkatkan konsentrasi Ca²⁺ intraseluler melalui pelepasan Ca²⁺ dari gudang Ca²⁺ intraseluler. Selanjutnya DAG yang terbentuk akan mengaktifkan *PKC dependent -Ca²⁺* (*Protein Kinase*) melalui proses fosforilasi. Sebagian IP₃ termetilasi menjadi IP₄ (*Inositol tetraphosphate*) yang berfungsi mengatur pembukaan *channel voltage-dependent Ca²⁺* yang menyebabkan pemasukan Ca²⁺ dari ekstraseluler. Sebagian besar Ca²⁺ ini berperan langsung pada fosfolipid membran untuk terjadinya fusi membran. Protein G yang teraktivasi juga menstimulasi *phospholipase A2* (PLA) melalui pemecahan *phosphatidyl choline* (PC) menjadi *lysophosphatidyl choline* (LC) dan asam arachidonat (AA), dimana keduanya sangat fusogenik. Secara bersamaan *Phospholipase D* (PLD) diaktivasi oleh Protein G memecah PC menjadi asam fosfatidil (PA) dan *Choline* (Ch), yang juga bersifat fusogenik. Demikian juga Ca²⁺ bersifat fusogenik dengan melakukan netralisasi muatan negatif dari membran, sehingga menyebabkan terjadinya fase transisi dan separasi dari fosfolipid membran. Aktivasi terhadap protein G juga mengaktifkan *adenylate cyclase* (AC) yang menstimulasi produksi *cyclic Adenosin Mono Phosphate* (cAMP). cAMP yang diproduksi ini akan mengaktifkan enzim *Protein Kinase* (PK-A) yang penting untuk terjadinya reaksi akrosom. Protein G dan TK juga mengaktifkan

pertukaran Na^+ / H^+ menyebabkan suasana basa di dalam sitosol. Pertukaran influk Na^+ dan effluk H^+ , meningkatnya pH menyebabkan terjadinya fusi membran dan eksositosis akrosomal.

Spermatozoa yang mengalami reaksi akrosom dalam aksinya menembus ZP akan kehilangan semua komponen akrosomnya, kecuali segmen ekuator dan membran akrosom bagian dalam yang menutup bagian depan. Setengah kepala yang bertubungan langsung dengan ZP dapat menembus ZP dengan menggerakkan ekor. Gerakan ekor ini penting untuk keberhasilan penetrasi ZP. Yanagimachi (1994) menyebutkan ada dua hipotesis penembusan spermatozoa pada ZP, yaitu hipotesis mekanik dan enzimatis. Hipotesis mekanik menjelaskan bahwa penembusan spermatozoa dalam sel telur terjadi dengan cara membuka ZP secara mekanik melalui pergerakan ekor yang sangat kuat yang mampu menghasilkan tenaga sebesar 100 pN yang cukup kuat untuk menembus ZP. Hipotesis yang ke dua adalah hipotesis enzimatis, terjadi oleh peran enzim yang dilepaskan oleh spermatozoa, salah satunya adalah *hyaluronidase* yang dilepas oleh spermatozoa.

2.8. Antibodi terhadap ZP3 (anti-ZP3) Dan Penghambatan Fertilisasi

Imunisasi hewan betina dengan ZP3 murni dari spesies berbeda dapat menghasilkan antibodi terhadap ZP3 dan hewan yang diimunisasi. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi *self reactive* dapat

dihasilkan oleh hewan melalui imunisasi dengan antigen yang mempunyai sifat reaksi silang yang luas. Lebih lanjut dikemukakan bahwa antibodi terhadap antigen ZP3 telah ditunjukkan mampu menghalangi fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo* (Jackson *et al.*, 1998, Greenhouse *et al.*, 1999).

Beberapa peneliti telah melakukan penelitian dengan menguji ZP3 sebagai imunogen untuk menginduksi respon imun humoral yang diyakini dapat mengganggu *binding* antara ZP3 dan ligannya yang ada pada membran spermatozoa. Zona pellusida-3 telah dipakai sebagai imunogen pada imunisasi aktif dan mampu menghambat interaksi spermatozoa dengan sel telur pada fertilisasi *in vitro*. Antibodi hasil induksi ZP3 ini mampu menekan lebih dari 60 % proses *binding* antara spermatozoa dan sel telur manusia. Selanjutnya pada studi *in vivo* mampu menginduksi titer antibodi yang tinggi dan tidak ditemukan adanya kerusakan fungsi ovarium (Paterson *et al.*, 2002).

Mahriani (2002) melaporkan keberadaan anti-bZP3 pada gambaran imunohistokimia sediaan ovarium kelinci yang mendapat imunisasi bZP3. Selanjutnya juga dilaporkan bahwa imunisasi bZP3 pada kelompok kelinci tidak menimbulkan gangguan terhadap gambaran histologi ovarium maupun perkembangan folikel. Imunisasi dengan bZP3 pada kelompok kelinci dihasilkan rataan jumlah folikel primordial yang sama dengan kontrol melalui pewarnaan

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Interaksi pertama antara spermatozoa dan zona pellusida merupakan suatu proses *binding* yang kompleks yang melibatkan reseptor, baik yang ada pada sel telur maupun spermatozoa (Hinsch *et al.*, 1994, Naz *et al.*, 2000; Tulsiani, 2000; Talbot *et al.*, 2003). Hal ini berarti bahwa reseptor protein spermatozoa pada ZP tertutup oleh suatu molekul karbohidrat yang kompleks, dimana molekul ini harus terlepas atau terhidrolisis lebih dulu oleh enzim yang dihasilkan pada tudung spermatozoa agar spermatozoa mencapai rantai protein yang merupakan reseptor primernya yaitu molekul protein dari ZP3

Zona pellusida-3 merupakan molekul glikoprotein yang terglykosilasi melalui *N-* dan *O-linked oligosaccharide* (Tulsiani, 2000, Talbot *et al.*, 2003). Antibodi tertiadap ZP3 telah diyakini mampu menghalangi fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo* (Jackson *et al.*, 1998, Greenhouse *et al.*, 1999). Beberapa peneliti telah melakukan penelitian dengan menguji ZP3 sebagai imunogen untuk menginduksi respon imun humoral, yang diyakini dapat mengganggu *binding* antara ZP3 dan ligannya yang ada pada membran spermatozoa. Namun dari data penelitian lain menjelaskan bahwa antibodi ZP3 bereaksi sangat

lemah dengan ZP3 terglukosilasi, tetapi reaktivitas ini diduga dapat ditingkatkan dengan memperbaiki kualitas protein yang dipakai untuk induksi anti-ZP3 (Tulsiani, 2000). Antibodi hasil induksi ZP3 terdeglikosilasi diduga akan menghambat pengikatan reseptor spermatozoa, sehingga diduga dapat menghambat proses fertilisasi secara *reversible*.

3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, kajian teoritis dan kerangka konseptual penelitian, maka hipotesis penelitian adalah :

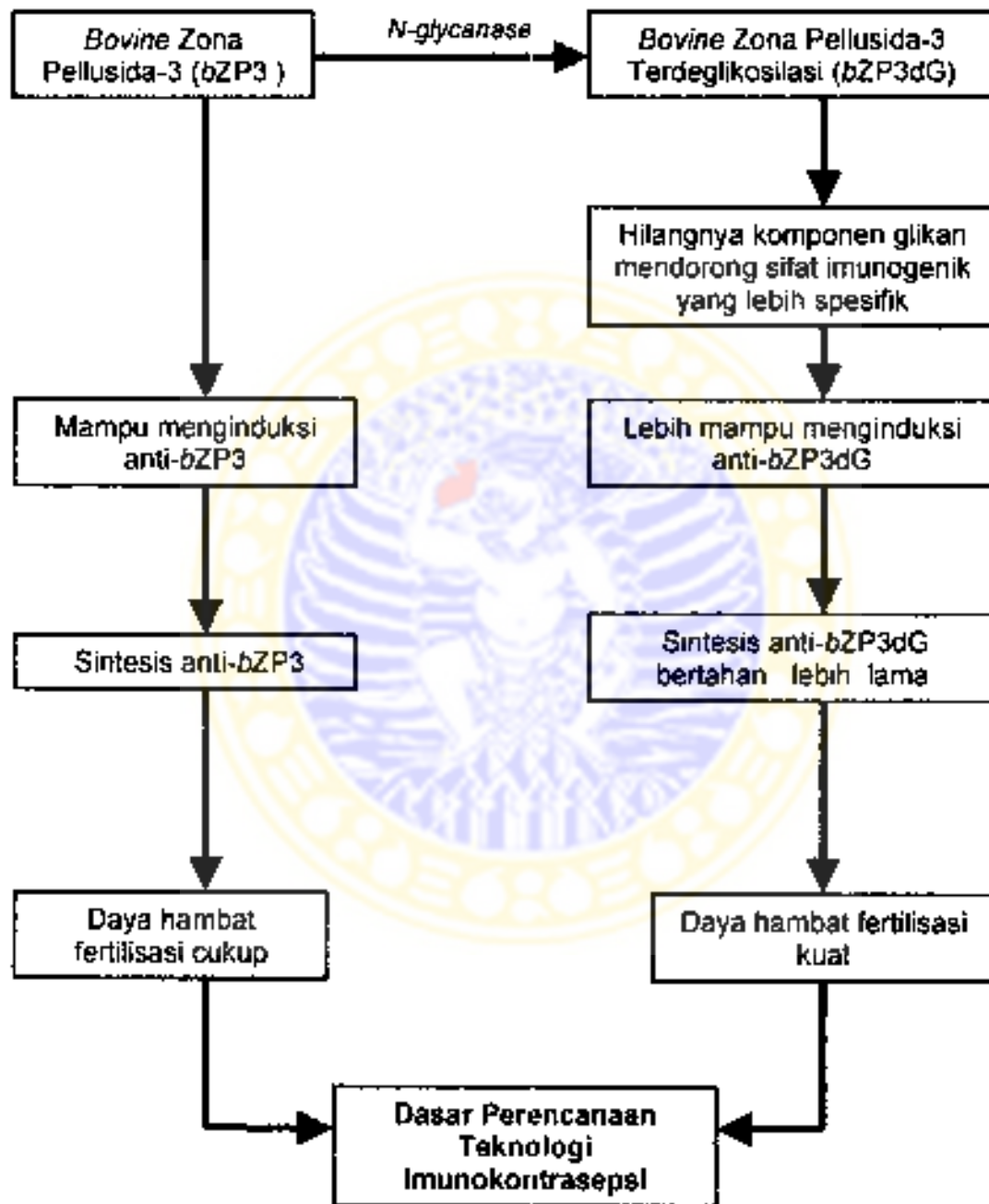
Antibodi hasil induksi bZP3 terdeglikosilasi (bZP3dG) lebih efektif daripada anti-bZP3 hasil induksi bZP3 dalam menghambat fungsi pengikatan reseptor spermatozoa dan proses fertilisasi secara *reversible*.

Adapun penjabaran dari hipotesis ini atau sebagai sub hipotesis adalah bahwa.

- 3.2.1. Hilangnya ikatan glikan pada bZP3dG menyebabkan adanya perbedaan karakter biokimiawi dengan bZP3.
- 3.2.2. Hilangnya ikatan glikan pada bZP3 mempengaruhi profil antibodi hasil induksinya.

- 3.2.3. Antibodi hasil induksi bZP3 dan bZP3dG mampu menghambat fungsi pengikatan reseptor spermatozoa.
- 3.2.4. Antibodi hasil induksi bZP3dG lebih efektif menghambat proses fertilisasi secara *reversible* dibandingkan dengan antibodi hasil induksi bZP3.





Gambar 3.1. Skematis Kerangka Konseptual Penelitian

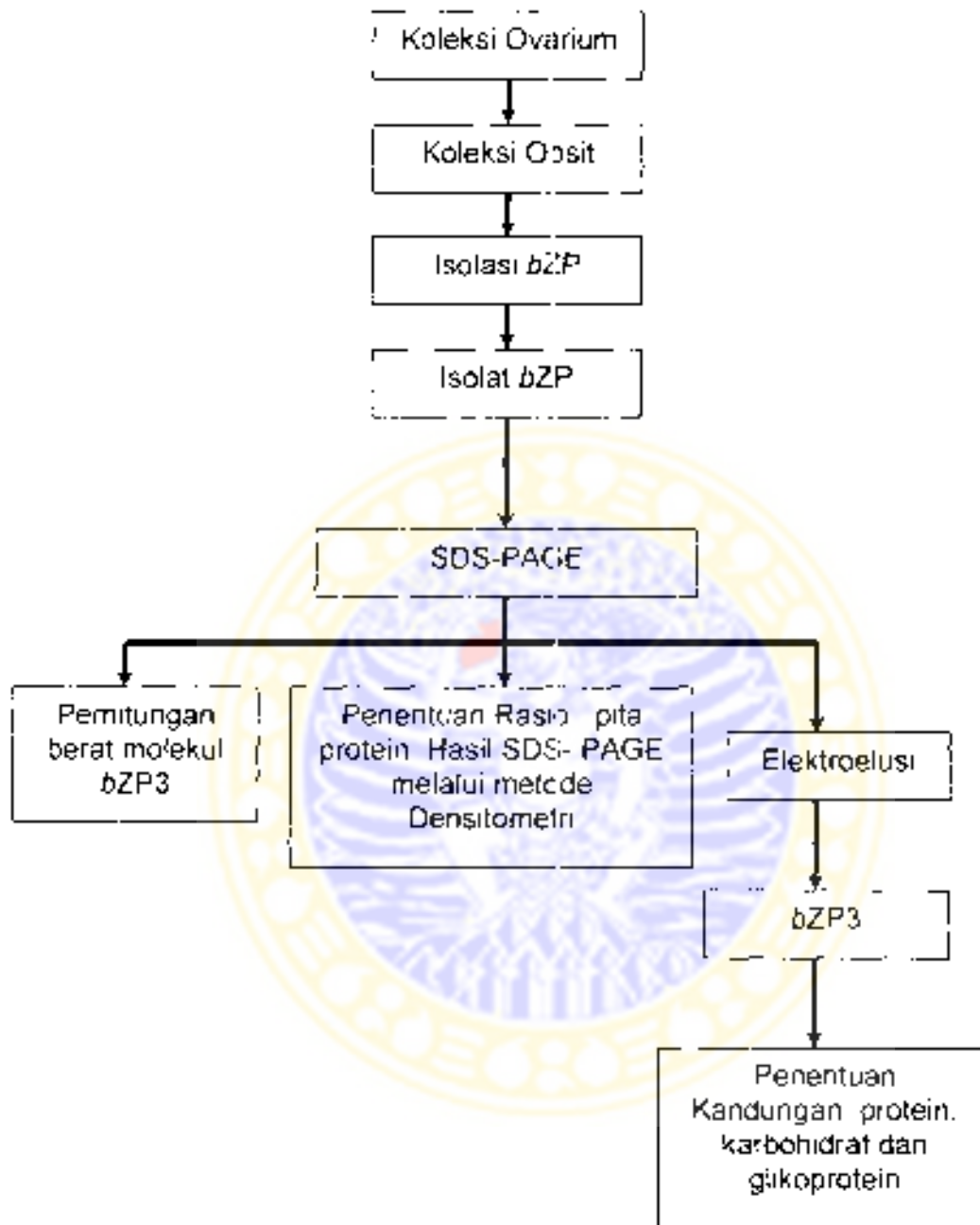
BAB 4

METODE PENELITIAN

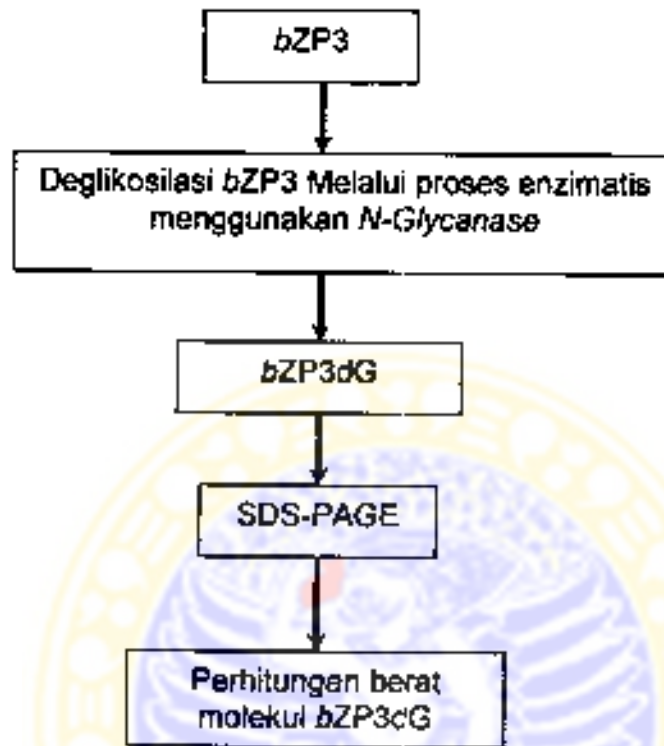
4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah studi eksperimental laboratorium eksploratif. Dalam rangka membuktikan hipotesis, strategi penelitian ini dapat dibagangkan melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

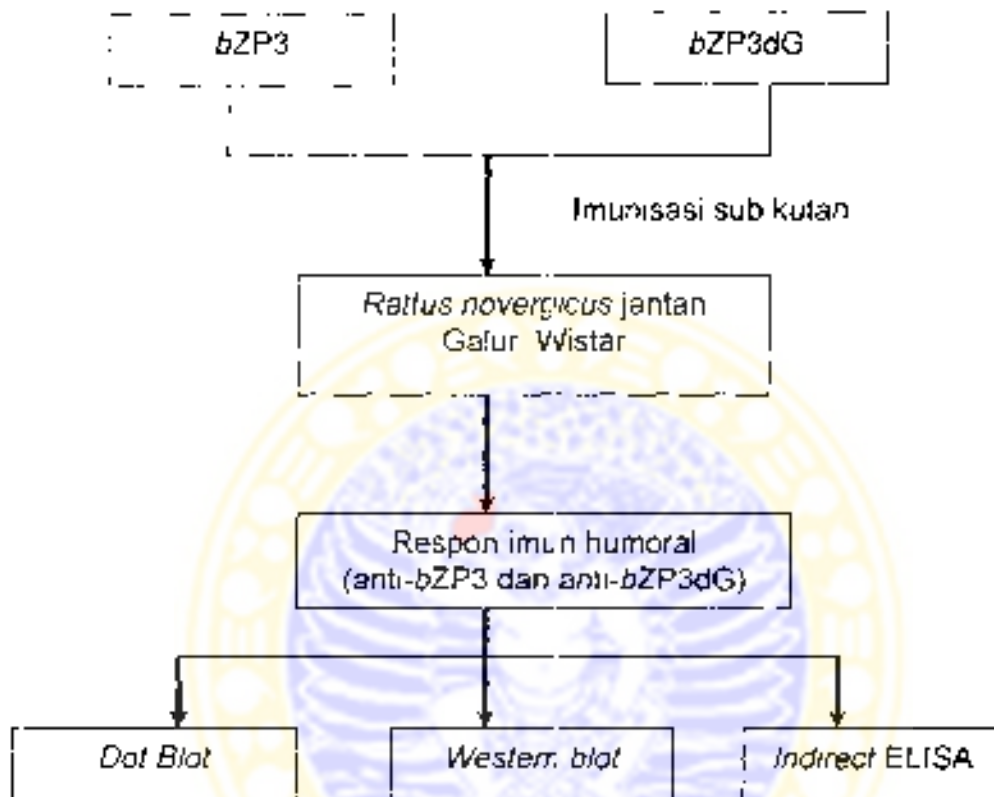
1. Karakterisasi glikoprotein *bZP3*
2. Karakterisasi *bZP3dG* hasil deglikosilasi secara enzimatis dengan menggunakan enzim *N-glycanase*
3. Karakterisasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* melalui evaluasi spesifisitas reaksi menggunakan metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*
4. Uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*.
5. Evaluasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* sebagai penghambat fertilisasi *in vivo*



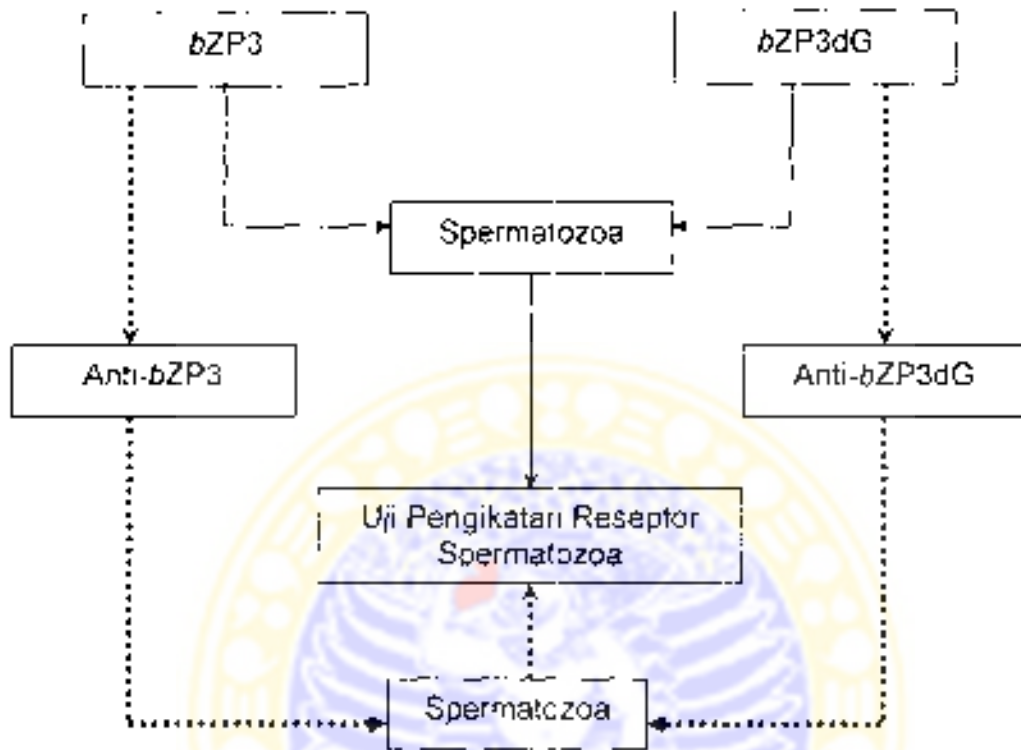
Gambar 4.1. Bagan Rancangan Peneiitan 1 Karakterisasi Glikoprotein bZP3



Gambar 4.2. Bagan Rancangan Penelitian 2 :
Karakterisasi *bZP3dG* Hasil Deglikosilasi Secara
Enzimatis Dengan Menggunakan Enzim *N-glycanase*

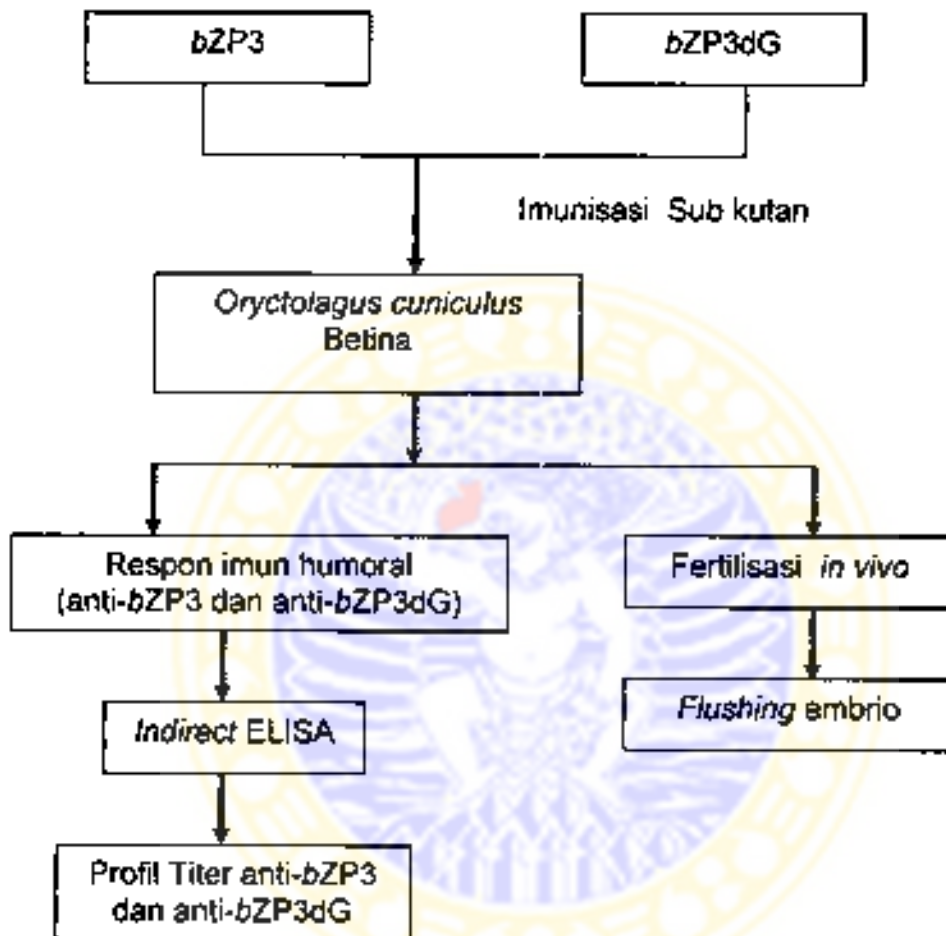


Gambar 4.3 Bagan Rancangan Penelitian 3 :
Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui
Evaluasi Spesifitas Reaksi Menggunakan Metode
Dot Blot , *Western Blot* dan *indirect ELISA*



Gambar 4.4. Bagan Rancangan Penelitian 3 : Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG





Gambar 4.5. Bagan Rancangan Penelitian 5 :
Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai
Penghambat Fertilisasi *In Vivo*

Penelitian 1 adalah percobaan untuk melakukan karakterisasi dari molekul *bZP3*. Pada tahap ini dilakukan penentuan kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein dan isolat *bZP* maupun *bZP3*.

Penelitian 2 yaitu penelitian untuk menghilangkan karbohidrat yang terikat melalui *N-linked Oligosaccharide* pada rantai polipeptida molekul *bZP3* menggunakan enzim *N-glycanase*. Pada tahap ini dilakukan penentuan berat molekul dari molekul *bZP3* hasil deglikosilasi (*bZP3dG*).

Penelitian 3 adalah penelitian untuk mengetahui kemampuan *bZP3* dalam menginduksi anti-*bZP3* juga *bZP3dG* dalam menginduksi anti-*bZP3dG* pada kelompok hewan coba tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar. Uji spesifitas antara imunogen dan antibodi yang ditimbulkan diuji menggunakan metode *Dot blot*, dilanjutkan *Western blot* untuk mengetahui kebenaran hasil induksi (anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*) dengan molekul penginduksi (*bZP3* dan *bZP3dG*). Pada penelitian 3 ini juga dilakukan pemeriksaan antibodi hasil induksi *bZP3* dan *bZP3dG* melalui metode *indirect ELISA* untuk mengetahui profil antibodi hasil induksinya.

Penelitian 4 adalah penelitian untuk mengetahui fungsi pengikatan antara spermatozoa dengan reseptornya yaitu *bZP3* baik yang utuh ataupun yang telah mengalami deglikosilasi dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* maupun anti-*bZP3dG*. Data pada penelitian tahap ini adalah berupa gambar fotografi yang direkam menggunakan kamera digital dan disimpan sebagai file *JPG* menggunakan perangkat lunak

Adobe Photoshpe melalui komputer menggunakan program AverTVmedia

Penelitian 5 adalah penelitian untuk mengetahui kemampuan bZP3 dalam menginduksi anti-bZP3 juga bZP3dG dalam menginduksi anti-bZP3dG pada kelompok hewan coba kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) lokal. Uji profil anti-bZP3 dan anti-bZP3dG diamati melalui metode *indirect* ELISA. sedangkan uji infertilitas dan kembalinya fertilitas dilakukan melalui metode *flushing* embrio pada kelompok kelinci pasca imunisasi.

4.2. Populasi Dan Sampel Penelitian

4.2.1 Penelitian 1. Karakterisasi glikoprotein bZP3.

Sampel pada penelitian 1 ini adalah ovarium sapi yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH), kemudian dilakukan aspirasi untuk mendapatkan oosit sebagai bahan untuk isolasi dan karakterisasi bZP3.

4.2.2 Penelitian 2: Karakterisasi bZP3dG hasil deglikositasi secara enzimatis dengan menggunakan enzim *N-glycanase*

Sampel pada penelitian 2 adalah isolat bZP3 yang diperoleh dari penelitian 1.

4.2.3 Penelitian 3 Karakterisasi anti-bZP3 dan anti-bZP3dG melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode Dot blot Western Blot dan *indirect* ELISA.

Sampel penelitian 3 adalah *bZP3*, *bZP3dG* dan *Freund's adjuvant* sebagai kontrol pada imunisasi secara sub kutan pada kelompok Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar dengan jumlah pengulangan 8 kali

4.2.4 Penelitian 4. Evaluasi peran ikatan glikan pada glikoprotein *bZP3* melalui uji pengikatan reseptor spermatozoa

Sampel penelitian 4 adalah *bZP3* dan *bZP3dG* dengan jumlah pengulangan 8 kali.

4.2.5 Penelitian 5. Evaluasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* sebagai bahan penghambat fertilisasi *in vivo*.

Sampel penelitian 5 adalah *bZP3*, *bZP3dG* dan *Freund's adjuvant* sebagai kontrol pada imunisasi secara sub kutan pada kelompok kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) betina dengan jumlah pengulangan 8 kali.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Identifikasi Variabel Penelitian

Variabel pada rencana penelitian ini yaitu 1) variabel bebas, 2) variabel tergantung dan 3) variabel kendal.

- *Variabel bebas* meliputi

- Dosis *bZP3* dan *bZP3* terdeglikosikasi (*bZP3dG*) untuk
 - imunisasi kelompok hewan
 - uji imunologis dengan metode *dot blot* western

blot dan *indirect* ELISA

- Pengikatan reseptor spermatozoa
- uji daya hambat fertilisasi *in vivo*
- *Variabel tergantung* meliputi .
 - titer anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* pasca imunisasi
 - persentase angka fertilisasi *in vivo* berdasarkan ditemukannya embrio pasca imunisasi.
- *Variabel kendali* meliputi
 - cara deglikosilasi *bZP3* yaitu menggunakan enzim *N-Glycanase* dan umur hewan coba

4.3.2. Definisi Operasional Variabel

1. Karakter anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* meliputi .
 - a. Nilai titer anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* pasca imunisasi melalui metode *indirect* ELISA
 - b. spesifisitas reaksi antara *bZP3* terhadap anti-*bZP3* serta *bZP3dG* terhadap anti-*bZP3dG* menggunakan metode *Dot blot* dan *Western blot*.
- 2 Peran ikatan glikan pada molekul *bZP3* diamati melalui uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*
3. Daya hambat fertilisasi : adalah penghambatan fertilisasi *in vivo* pada kelompok hewan coba kelinci betina yang dimunisasi *bZP3*

dan bZP3dG. diukur melalui ditemukannya embrio fase morula pasca imunisasi

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan penelitian berupa ovarium segar dari sapi yang diperoleh dari beberapa Rumah Potong Hewan (RPH) di Malang dan Surabaya. Ovarium segera disimpan dalam NaCl fisiologis 0,9 % yang mengandung penisilin 100 IU/L dan Streptomisin 100 µg/L.

4.4.2. Reagen Kimia:

Beberapa bahan kimia yang dipakai dalam penelitian ini adalah . Na-citrat (Sigma, S-4541), ddH₂O; *Deionized water* (nanopure); Tween-20 (Biorad, cat. 170-6531), fosfat buffer salin-Tween (PBS-T, pH 7.4); bufer Carbonat-bicarbonat , NaCl (Sigma, S-7653); asam sitrat (Sigma, C-0909); penisillin (Meiji); streptomisin (Meiji); *sodium azide* (sigma, S-8032); "Glycoprotein Carbohydrat Estimation Kit " (Pierce, cat. No. 23260), "Glycoprotein Staining Kit " (Pierce, cat 24562); amonium sulfat (Sigma, A-2939); Amonium Persulfat (APS, Biorad cat 161-0700); Casein (Sigma.C-5890). *Bovine Serum Albumin* (BSA, B 4287), bufer tris-glisin, bufer fosfat; bis-akrilamid (plus one, cat. 17-13041); poliakrilamid (Promega, V311A), *Sodium Dodecyl Sulfonat* (SDS, Biorad, Cat 161-0301); TEMED (Sigma),

mercaptoethanol (Biorad, cat. 161-0710); Commasie Brilliant Blue R250 (Sigma C-7920); Commasie Brilliant Blue G250 (Sigma C-7920); Bromophenol blue (Merck 8122-0025); marker protein (Biorad), Glisin (Sigma G7403), Ampholite (Sigma, A10043), *N-Glycanase* (Rec. *N-glycanase*TM, Glyko, E-5006); kloroform (Merck), ethanol (Merck), methanol (Merck, 822158), *Complete Freund's Adjuvant* (CFA, Sigma F585); *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA, sigma F5506); Anti-Rat-IgG AP conjugate (Promega), Anti-Rabbit-IgG Alkaline fosfatase conjugate (Biorad, S3831); Diethanolamine (Sigma D0683); pNPP (*para*-Nitrophenylphosphat, Sigma N9339); Membran Nitroselulosa, MgCl₂ (Sigma, M0250)

4.4.3 Hewan Coba : Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar umur 3 bulan, yang diperoleh dari PUSVETMA Surabaya, dan kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) lokal yang telah beranak satu kali, yang diperoleh dari Peternak di kota Batu Malang

4.4.4 Peralatan .

Alat yang dipakai dalam penelitian ini adalah *waterbath*, *freezer -40°*; *refrigerated centrifuge*, seperangkat peralatan gelas, *synnge disposable 18 G* dan *21 G* (Terumo Co., Europe), cawan petri diameter 5 c, pinset, pipet Pasteur steril, Polypropylen

tubes 15 ml; oven; mikroskop inverted; mikroskop cahaya; neraca analitik merk Sartorius tipe PE – 620; pH meter merk *Schoof-Gerate* tipe CG 820; *Autoclave*; Biorad *elektrophoresis* (Vertikal dan Horisontal); spektrofotometer UV-Vis; micropipet, tip-micropipet; kantong dialisis (Sigma, D9652), dot blotter (Biorad), transfer blotter (Biorad), ELISA reader (Biorad), plate ELISA dan mikroskop (Nikon microscope OPTIPHOT-2).

4.5. Lokasi Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Biologi Molekuler Fakultas MIPA serta Biomedik Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Waktu Penelitian mulai bulan Januari 2002 sampai Januari 2003.

4.6. Prosedur Pengumpulan Data Penelitian

Penelitian I : Karakterisasi bZP3 Dari Oosit Sapi

Metode Pengumpulan Sampel Ovarium :

Sampel ovarium diperoleh dari sapi yang dipotong di beberapa RPH di daerah Kota Malang dan Surabaya segera dimasukkan dalam larutan NaCl 0,9 % steril yang mengandung antibiotik Penisilin 100 IU/liter dan Streptomisin 100 µg/liter. Ovarium yang diperoleh sesegera mungkin dibersihkan dari jaringan ikat dan lemak, kemudian dicuci dengan NaCl 0,9 % steril mengandung penisilin 100 IU/liter dan streptomisin 100

µg/liter, dan dilakukan pengumpulan oosit melalui aspirasi pada folikel yang berdiameter 3 mm - 5 mm

Metode Pengumpulan Oosit:

Ovarium sapi diambil dari RPH, dicuci 3 kali dengan NaCl 0,9 % suhu 38°C yang mengandung antibiotik. Ovarium diambil dengan menggunakan pinset steril dan permukaan dikeringkan dengan tissue steril. Syringe 22.5 G diisi dengan 1,5 ml medium pencuci, selanjutnya ditusukkan ke bagian parenkim ovarium dekat vesika folikel (bagian korteks). Folikel dengan diameter 3-5 mm yang berada dekat titik tusuk jarum diaspirasi, setelah semua terhisap kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan medium pencuci dan disimpan dalam waterbath pada suhu 38°C selama 10 menit. Bagian atas medium pencuci diambil dan diganti medium pencuci yang baru dan disimpan dalam waterbath selama 10 menit dan diulang sebanyak 2 kali. Cairan aspirasi yang sudah dicuci sebanyak 3 kali tersebut dituangkan ke dalam cawan petri steril diameter 50 mm. Semua oosit yang didapat, diperiksa dengan mikroskop inverted pembesaran 100X. Oosit diambil menggunakan pipet pasteur yang lubangnya dibuat sama dengan diameter oosit

Metode Isolasi Zona Pelusida Sapi (bZP)

Isolasi bZP dilakukan dengan metode mekanik. Metode mekanik dilakukan dengan cara menyobek dinding oosit dan mengeluarkan isinya. Penyobekan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 100X menggunakan *modified fine pipet* (Sumitro and Aulanniam, 2000 dan Aulanniam, dkk, 2001).

Metode Isolasi bZP3

Isolasi *native* glikoprotein bZP3 dilakukan dengan metode elektroelusi (Sumitro and Aulanniam, 2000) pada pita yang muncul dalam running SDS-PAGE terhadap total ZP yang telah dikonfirmasi dengan pewarnaan "*Glycoprotein Staining Kit*" dari Pierce (No Cat 24562).

Untuk memperoleh pita dari bZP3 dilakukan elektroelusi dalam *Electroelution chamber* terhadap hasil running SDS-PAGE sampel bZP3. Adapun caranya adalah satu sumuran gel hasil SDS-PAGE berisi *marker* dengan pewarnaan *Coomassie Brilliant Blue R-250*, dan satu sumuran yang berisi sampel diwarnai "*Glycoprotein Staining Kit*" dari Pierce (No Cat. 24562). Bagian gel yang lain dipotong pada posisi pita bZP3. Potongan pita pada gel ini dimasukkan dalam kantong selofan (kantong dialisis) dan dielektroelusi dalam 2,5 mM buffer Tris-glisin (pH 8,3) pada kondisi konstan current 20 mA, 250 volt pada suhu 4°C (Cool Room) selama 12 jam. Hasil elektroelusi ini kemudian dikarakterisasi

berdasarkan kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein serta berat molekul (BM). Selanjutnya isolat bZP3 dipakai sebagai bahan induksi biosintesis antibodi terhadap bZP3 (anti-bZP3) dan dilakukan proses deglikosilasi untuk mendapatkan bZP3 terdeglikosilasi (bZP3dG) serta anti-bZP3dG. Kemudian dilakukan karakterisasi berdasarkan evaluasi spesifitas reaksi imunologis menggunakan metode Dot blot dan *Western blot* untuk selanjutnya dievaluasi sebagai bahan penghambat fertilisasi.

Metode Karakterisasi Biokimiawi bZP3

Karakterisasi bZP3 dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat biokimiawi masing-masing glikoprotein bZP hasil isolasi yaitu: kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein (Walker, 1994 ; Sumitro, dkk.,1998). Karakterisasi parameter diatas dilakukan dengan menggunakan "*Glycoprotein Carbohydrate Estimation Kit*" dari Pierce (No. Cat. 23260) dan metode Biuret secara spektrofotometri. Penentuan kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel dilakukan sebagai berikut .

Disiapkan 3 *eppendorf*, 2 *eppendorf* diisi 0,4 ml glikoprotein *assay buffer* sebagai blanko dan 1 *eppendorf* diisi 16,7 μ l sampel ZP dan diencerkan sampai volume 0,4 ml dengan pelarut glikoprotein *assay buffer*. Kemudian masing - masing *eppendorf* ditambahkan 0,2 ml Kalium Periodat 10 mM, dihomogenkan dengan vortex, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Selanjutnya masing - masing *eppendorf* di

tambahkan 0,6 ml glikoprotein detection reagent 0,5%, dihomogenkan dengan vortex dan diinkubasi pada suhu ruang selama 1 jam. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV- Vis pada λ maks. 550 nm dan diulangi 3 kali.

Kandungan glikoprotein dan karbohidrat dari sampel diperoleh dengan membandingkan dengan larutan standar proteinnya, menggunakan rumus :

Glikoprotein(mg/ml) =

$$\frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times C \text{ protein(mg/ml)} \times \text{pengenceran}$$

Karbohidrat (mg/ml) =

$$\text{Kandungan glikoprotein} \times \% \text{ total karbohidrat standar}$$

Penentuan Protein menggunakan metode Biuret diawali dengan pembuatan kurva standar BSA (Lampiran 3.4). Preparasi pengukuran protein dari sampel dilakukan sebagai berikut :

Kandungan protein ZP ditentukan menggunakan reagen biuret dengan penambahan larutan standar BSA. Diambil 0,5 mL sampel ZP ditambah 1 mL larutan standar BSA 5000 ppm dan 4 mL reagen biuret, kemudian dikocok dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV - VIS pada λ maksimum yaitu 550 nm. Sebagai blanko dipipet 1,5 mL air dan ditambah 4 mL reagen biuret, dikocok dan didiamkan selama 30 menit

pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya dan diulangi 3 kali. Kandungan protein diperoleh dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA, menurut Hamilton, (1992) menggunakan rumus :

$$Y = aX \quad , \quad X = \frac{Y}{a} \quad \text{di mana } X = \text{konsentrasi total protein}$$

Penentuan Berat Molekul protein dari bZP3dG dengan metode SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue R-250*, sedangkan untuk berat molekul relatif glikoprotein bZP3 menggunakan '*Glycoprotein Staining Kit*' dari Pierce (No. Cat. 24562)

Penentuan Berat Molekul Protein (BM) dari pita-pita protein yang muncul ditentukan dengan menggunakan protein standar yang dilanjutkan dengan menghitung mobilitas relatif (Rf) menurut Surnitro dkk. (1998)

Dua dimensi elektroforesis (IEF-SDS-PAGE) dilakukan untuk mengetahui migrasi masing-masing pita hasil satu dimensi SDS-PAGE. Adapun langkah metode ini adalah sebagai berikut :

Isolat ZP sebanyak 600-700 ZP dilarutkan dalam 20 µl larutan urea 8.5 M yang mengandung, 2% ampholine (pH 4-7), 5% B-mercaptoetanol, 1% NIP 40. Sampel diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian disimpan pada -20 °C dan sebelum *running* sampel dipanaskan pada air mendidih selama 2 menit.

Gel dibuat dari larutan yang mengandung; 4% Akrilamid, 0,2% N N methylene bisacrylamid, 8,5 M urea 2% ampholine (pH 3,5-9 dan 4-

6,5) dan disusun pada alat *isoelectric focusing*. Tangki bawah diisi dengan 10 mM H_3PO_4 , sedang tangki atas diisi dengan 20 mM NaOH, kemudian dilakukan *pre-running* pada 400 volt selama 30 menit.

Sampel dimasukkan sumuran gel dan dilakukan *running* pada konstan volt 400 V selama 3,5 jam, kemudian gel dikeluarkan, dan direndam dalam 62.5 mmol Tris-Cl bufer pH 6.8, 2 % SDS, 5% mercaptoethanol selama 30 min.

Gel hasil *isoelectric focusing* kemudian diletakkan diatas 10% gel akrilamid. Running elektroforesis SDS PAGE dilakukan pada constant current 20 mA selama 1 jam. Selanjutnya gel dikeluarkan dan dilakukan pewarnaan dengan menggunakan "Glycoprotein Staining Kit" dari Pierce (No. Cat 24562).

Rasio antara molekul bZP yang muncul ditentukan melalui densitogram menggunakan densitometer terhadap hasil running SDS-PAGE 10 %. Analisa densitometrik terhadap gel hasil elektroforesis diatas sebuah lempeng aluminium yang dibasahi dengan sedikit akuades, untuk menghindari agar gel tidak mengering. Gel dimasukkan ke dalam *Scanning chamber*, lampu iluminasi dinyalakan dan diarahkan pada pita-pita pada gel yang akan di-scan. Satu sumuran (*well*) tersebut diarahkan agar dilewati oleh cahaya iluminasi yang merupakan seberkas cahaya hijau yang berupa garis tipis. Pada proses ini teridentifikasi lebar dan panjang sumuran yang akan di-scan. Langkah selanjutnya adalah mengisi parameter yang perlu diukur (lebar pita, panjang sumuran dan panjang

gelombang) pada perangkat lunak yang membaca dan mengolah hasil *scanning*. Selanjutnya *scanning chamber* ditutup dan proses *scanning* dilangsungkan.

Penelitian 2 : Karakterisasi bZP3dG Hasil Deglikositasi Secara Enzimatis Dengan Enzim *N-glycanase*

Proses deglikositasi terhadap molekul *bZP3* dilakukan menurut metode Tulsiani (2000). Enzim *N-glycanase* yang dipakai adalah PNGaseF (No. cat. E-5006, produk Genzyme Corporation).

Tahap-tahap penelitian 2 :

Metode Deglikositasi *bZP3*

Isolat *bZP3* sebanyak 500 µg ditambahkan dalam 45 µL 1x bufer inkubasi. Kemudian ditambahkan 2,5 µL SDS dengan konsentrasi akhir adalah 0,1 % dan dilakukan proses denaturasi terhadap glikoprotein melalui pemanasan 100 °C selama 5 menit, dan selanjutnya dibiarkan sampai dingin. Ditambahkan 2,5 µL NP-40 dengan konsentrasi akhir adalah 0,75 % dan ditambahkan 2µL *N-Glycanase* semalam pada suhu 37 °C. Selanjutnya disimpan pada -20 °C.

Isolat *bZP3dG* dikarakterisasi berat molekul protein melalui SDS-PAGE. Selanjutnya *bZP3dG* dipakai sebagai bahan induksi biosintesis anti-*bZP3dG* dan dikarakterisasi berdasarkan evaluasi spesifitas reaksi immunologis menggunakan metode *Dot blot* dan

Western Blot untuk selanjutnya dievaluasi sebagai bahan penghambat fertilisasi *in vivo*.

Metode Karakterisasi Biokimiawi bZP3dG

Karakterisasi bZP3dG dilakukan untuk mengetahui sifat-sifat biokimiawi bZP3dG meliputi berat molekul protein inti berdasarkan metode SDS-PAGE menggunakan pewarnaan *Commasie Brilliant Blue R-250* dengan menentukan dengan menggunakan protein standar yang dilanjutkan dengan menghitung mobilitas relatif (Rf) menurut Sumitro dkk. (1998)

Penelitian 3: Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Menggunakan Metode Dot Blot, Western Blot Dan *indirect* ELISA

Immunisasi Tikus Dengan bZP3 Dan bZP3dG

Hewan coba yang diimunisasi bZP3 dan bZP3dG adalah Tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar, setelah diaklimatisasi dikelompokkan menjadi 3 perlakuan (tiap perlakuan dilakukan 8 kali ulangan, tiap ulangan 2 ekor). Adapun perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut :

a. Perlakuan 1 (Kontrol)

Enam belas ekor tikus diimunisasi tanpa *bZP3* atau *bZP3dG*, yaitu hanya dengan *Freund's Adjuvant* (CFA dan IFA) 100 µ/ekor. IFA diberikan untuk *booster*.

b. Perlakuan 2

Enam belas ekor tikus diimunisasi dengan isolat *bZP3* dengan *Freund's Adjuvant* (CFA dan IFA) dengan perbandingan dosis antara adjuvant dengan *bZP3* adalah : 1 :1, yaitu 150 µg/150 µl. IFA diberikan untuk *booster*.

c. Perlakuan 3

Enam belas ekor tikus diimunisasi dengan isolat *bZP3* terdeglisosilasi (*bZP3-DG*) dengan *carrier Freund's Adjuvant* (CFA dan IFA) dengan perbandingan dosis *bZP3* : adjuvant 1 :1, yaitu 150 µg/150 µl. IFA diberikan untuk *booster*.

Pada hewan percobaan yang diimmunisasi , dilakukan *booster* dengan dosis yang sama menggunakan *bZP3* dan *bZP3dG* dan pemanenan berdasarkan prosedur standar (Biosystem, 1999)

Imunisasi pertama dilakukan pada perlakuan kontrol hanya digunakan CFA, sedangkan pada perlakuan 2 dan 3 diinjeksikan berturut-turut dengan 150 µl *bZP3* dan 150 µl *bZP3dG* ke dalam *Complete Freund's Adjuvant*. Injeksi dilakukan di bagian *sub cutant* pada beberapa sisi. Imunisasi ke dua dan ke tiga dilakukan menambahkan 150 µl *bZP3* dan *bZP3dG* ke dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* yang disebut

sebagai *booster I* pada hari ke 28 dan *booster II* pada hari ke 90 pasca imunisasi pertama. Pengambilan darah dilakukan melalui vena *lateralis* ekor, volume darah yang didapatkan berkisar antara 250-500 μ l tiap ekor tikus (Biosystem, 1999).

Pengambilan Serum

Darah yang diambil melalui vena *lateralis* ekor, ditampung dalam tabung *ependorf*, didiamkan sekitar 10 menit dalam suhu kamar, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit sehingga terbentuk dua lapisan. Supernatannya merupakan serum dan kemudian dimasukkan pada *cryotube* untuk selanjutnya disimpan dalam freezer dengan suhu -70°C atau digunakan untuk pemurnian IgG dan pengukuran titer anti-bZP3 dan anti-bZP3dG dengan metode *indirect ELISA*, spesifitas reaksi terhadap bZP3 dan bZP3dG melalui metode *Dot blot* dan *Western blot*.

Pemanenan Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Dari Serum

Serum yang diperoleh dimurnikan dengan penambahan Amonium Sulfat jenuh (SAS 50 %) dengan perbandingan volume yang sama antara serum dengan SAS 50 %, dihomogenkan selama 1 menit, didiamkan selama 10 menit pada suhu 5°C . Serum ini kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4°C . Supernatan dibuang, presipitat ditambahkan SAS 50 % sebanyak

sepuluh kali volume, serum dihomogenkan kemudian disentrifugasi lagi dengan kecepatan yang sama selama 30 menit. Supernatan dibuang, presipitat ditambahkan 0,05 M bufer fosfat pH 7 dengan volume yang sama, dimasukkan ke dalam kantong selofan, dilakukan dialisis dalam 0,01 M bufer fosfat pH 7 pada suhu 5°C selama 24 jam, akhir dialisis diaduk dengan menguji bufer dialisis diluar kantong selofan dengan larutan BaCl₂ (apabila sudah tidak terbentuk endapan putih BaSO₄, dialisis dihentikan). Anti-bZP3 dan anti-bZP3dG yang dihasilkan disimpan dalam freezer dengan suhu -70°C untuk uji *immunoblotting* dengan metode *Dot blot* dan *Western blot* dan *indirect ELISA*.

Pengukuran Titer Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG

Pada pengukuran titer anti-bZP3 dan anti-bZP3dG dipakai metode *indirect ELISA* untuk mengetahui titer dari anti-bZP3 dan anti-bZP3dG. Mikropate 96 well di *coating* dengan bZP3 atau bZP3dG sebanyak 100 µl, kemudian diinkubasikan pada 4°C selama 24 jam. Setelah itu dilakukan pencucian dengan 0,05% PBS-Tween 20 sebanyak 6 kali dan diblok dengan BSA grade 5 dengan konsentrasi 1% kemudian dicuci seperti diatas. Setelah itu direaksikan dengan anti bZP3 atau anti-bZP3dG sebanyak 100 µl dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 jam. Selanjutnya dicuci 6 kali dan direaksikan dengan antibodi kedua konjugat Alkaline fosfatase dan diinkubasikan pada 37°C selama 1 jam kemudian dicuci dan akhirnya ditambahkan substrat pNPP dan jika warna pada

kontrol sudah berubah menjadi kuning maka reaksi dihentikan. Hasil liter anti-bZP3 dan anti-bZP3dG dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD

Metode Dot Blot

Isolat bZP3 dan bZP3dG dalam PBS-Na Azida 1% diteteskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi dengan PBS. Membran yang berisi antigen ini kemudian diblokir dengan *blocking buffer* selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 (3 menit yang diulang 3 kali). Hasilnya kemudian diinkubasi dengan serum (anti-bZP3 atau anti-bZP3dG) dalam PBS-Skim Milk 1 % selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 (3 menit yang diulang 3 kali). Hasil yang didapatkan inkubasi kembali dengan antibodi sekunder (*Anti Rat IgG AP Conjugate*) selama 1 jam dan dicuci kembali dengan PBS-Tween 20 0,05 % selama 3 menit yang diulang 3 kali. Kemudian dilakukan inkubasi dalam substrat *Western Blue* dan dikeringkan pada suhu kamar.

Metode Western Blot

Western blot dilakukan dengan menggunakan fragmen pita bZP3 dan bZP3dG yang telah dirunning dalam SDS-PAGE dalam kondisi tereduksi dan ditransferkan pada membrane Nitroselulosa. Membran diblok dengan 3 % BSA dalam 20 mM Tris-Cl pH 7,5 dan 150 mM NaCl selama satu jam, selanjutnya diinkubasi dalam Tris/NaCl yang mengandung 1% BSA dengan anti-bZP3 atau anti-bZP3dG, sebagai

antibodi primer. Kemudian dicuci dalam Tris-Cl yang mengandung 0,05 % Tween 20. Selanjutnya membran diinkubasi dengan antibodi sekunder (anti-Rat IgG label AP, pengenceran 1:1000) dan ditambahkan substrat western blue.

Penelitian 4 : Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG.

Penyiapan Spermatozoa

Semen sapi yang diperoleh dilakukan pemeriksaan makroskopis yaitu volume, warna, bau, pH dan konsistensi dan pemeriksaan mikroskopis meliputi motilitas individu, motilitas massa, persentase hidup dan konsentrasi. Uji kualitas semen sapi meliputi motilitas individu, persentase hidup dan konsentrasi. Selanjutnya semen sapi diencerkan dengan medium *Bracket and Olliphant's* (BO). Selanjutnya dilakukan uji pengikatan reseptor bZP3, bZP3dG dengan spermatozoa dengan dan tanpa kehadiran anti-bZP3 dan atau anti-bZP3dG.

Metode Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa

Isolat bZP3 dan bZP3dG dalam PBS dengan dan tanpa anti-bZP3 dan anti-bZP3dG dilapiskan pada glass slide yang telah dimodifikasi dengan melakukan grafiti bentukan garis memanjang pada bagian tengah. Kemudian dilakukan *blocking* dengan PBS-Skim 5 % selama didalam ruang dingin. Sebelum direaksikan ditambahkan spermatozoa pada glass

slide tersebut, maka terlebih dahulu dilakukan pencucian *glass slide* dengan PBS-Tween 20 0,05% sebanyak 3 kali tiap 3 menit. Reaksi spermatozoa dengan reseptornya dilakukan selama 45 menit pada suhu 37 °C. Selanjutnya dicuci dengan PBS-Tween 20 0,05 % (3 menit yang diulang 3 kali), difiksasi dengan 2% glutaraldehid dan dilakukan pewarnaan menggunakan CBB G250 (*Comasie Brilliant Blue G-250*). Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dan data berupa gambar yang direkam menggunakan kamera digital dan disimpan sebagai file JPG menggunakan perangkat lunak Adobe Photoshope melalui komputer menggunakan program AverTVmedia.

Penelitian 5 : Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Terhadap Daya Hambat Fertilisasi *In Vivo*

Untuk keperluan fertilisasi *in vivo* dipakai kelompok hewan coba kelinci betina dan kelinci jantan lokal (*Oryctolagus cuniculus*), yang diperoleh dari Peternak di Kodya Batu. Imunisasi diberikan dosis yaitu @ 200 µg/400 µL. Perlakuan yang diberikan adalah .

- 1) Imunisasi hanya dengan *Freund's adjuvant*
- (2) Imunisasi dengan isolat *bZP3* dalam *Freund's adjuvant*
- (3) Imunisasi dengan isolat *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant*

Titer antibodi terhadap *bZP3* dan *bZP3dG* diukur dengan metode *indirect ELISA* pada hari ke 38, 45, 52, 66, 73, 80, 87, 105,



112, 119, 126, 133, 140, 147 dan 154 pasca imunisasi. Daya hambat fertilisasi dan kembalinya daya fertilitas diamati dengan melakukan *flushing* embrio.

Penyiapan Hewan Coba

Hewan coba yang dipakai dalam penelitian ini adalah kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) lokal, yang berasal dari Batu yang telah beranak satu kali, mendapat perlakuan imunisasi dan hewan jantan disiapkan untuk uji terhadap daya hambat fertilisasi.

Hari ke-60, 90, 120, 150, 180, dan 210 pasca imunisasi hewan coba dikawinkan dengan cara memasukkan dalam kandang pejantan ratio = 1 : 5). Kelinci yang telah dikawinkan, 72 jam kemudian dikorbankan dan dibedah selanjutnya diambil saluran reproduksinya yang terdiri dari oviduk dan uterus. Kemudian dibersihkan dari jaringan ikat dan lemak yang ada disekitarnya, dan dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9 %

Metode *Flushing* Embrio :

Saluran reproduksi kelinci yang berupa oviduk dan uterus dipisahkan antara bagian kanan dan bagian kiri. Setelah itu dilakukan *flushing* embrio pada masing-masing bagian tersebut, dengan cara menggelontor saluran reproduksi dari pangkal oviduk hingga uterus dengan 10 ml PBS menggunakan spuit injeksi 22,5 G. Hal ini dilakukan sebanyak 2 kali. Embrio hasil *flushing* ditampung dalam cawan Petri dan

diamati fase perkembangan embrio dengan menggunakan mikroskop inverted, serta dihitung jumlah embrio yang dihasilkan.

4.7. Analisis Data

4.7.1. Penelitian 1 : Karakterisasi Glikoprotein *bZP3*

Penelitian 1 ini merupakan penelitian eksploratif, sehingga tidak ada analisis statistik, data disajikan secara deskriptif. Parameter yang diukur pada penelitian 1 adalah karakter biokimiawi meliputi kandungan glikoprotein, karbohidrat, protein dari molekul *bZP* dan *bZP3*, berat molekul pita-pita *bZP* dan *bZP3* serta rasio mol dari pita-pita yang muncul hasil SDS-PAGE

4.7.2. Penelitian 2 : Karakterisasi *bZP3dG* Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim *N-glycanase*.

Penelitian 2 ini merupakan penelitian eksploratif, sehingga tidak ada analisis statistik, data disajikan secara deskriptif. Parameter yang diukur pada penelitian 2 adalah berat molekul *bZP3dG* hasil SDS-PAGE.

4.7.3. Penelitian 3 : Karakterisasi Anti-*bZP3* Dan Anti-*bZP3dG* Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Menggunakan Metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*.

Penelitian 3 ini terdapat 3 perlakuan imunisasi menggunakan (1) hanya *Freund's adjuvant*, (2) *bZP3* dalam *Freund's adjuvant* dan (3)

bZP3dG dalam *Freund's adjuvant*, yang diberikan dengan lama imunisasi yang berbeda

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola faktorial (3x15) menggunakan 8 kali ulangan, tiap ulangan 2 ekor tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar. Faktor pertama Faktor pertama adalah jenis antigen (3 macam, yaitu *Freund's adjuvant*, bZP3 dalam *Freund's adjuvant* dan bZP3dG dalam *Freund's adjuvant*) dan faktor kedua adalah lama imunisasi (hari ke – 38, 45, 52, 59, 66, 73, 80, 87, 105, 112, 119, 126, 133, 140 dan 147 pasca imunisasi).

Analisis ragam digunakan untuk menguji pengaruh perlakuan terhadap profil antibodi.

4.7.4. Penelitian 4 : Evaluasi Peran Ikatan Glikan Pada Glikoprotein bZP3 Melalui Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa

Pada uji pengikatan reseptor spermatozoa ini tidak diperlukan analisis statistik, karena merupakan penelitian eksploratif untuk uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan dan tanpa kehadiran anti-bZP3 dan anti-bZP3dG. Adapun hasilnya disajikan secara deskriptif.

4.7.5. Penelitian 5 : Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai Penghambat Fertilisasi *In Vivo*

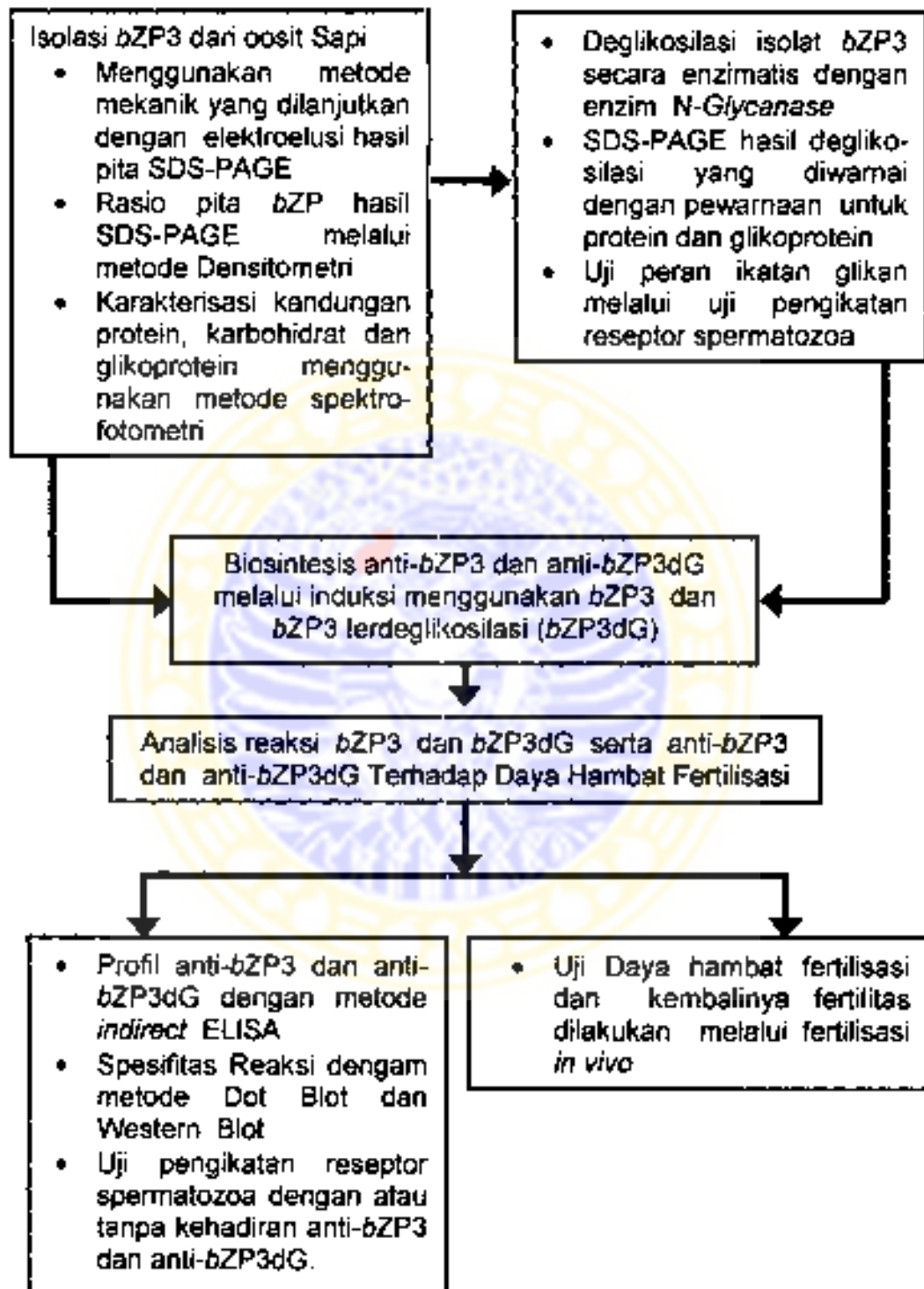
Penelitian 5 ini menguji profil antibodi hasil induksi serta daya hambat fertilisasi oleh 3 perlakuan imunisasi menggunakan (1) hanya

Freund's adjuvant, (2) *bZP3* dalam *Freund's adjuvant* dan (3) *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant*.

Penelitian ke-5 untuk melihat profil antibodi hasil induksi 3 perlakuan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3 X 16, menggunakan 8 ulangan. Faktor pertama adalah jenis antigen (3 macam, yaitu *Freund's Adjuvant*; *bZP3* dalam *Freund's adjuvant* dan *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant*) dan faktor kedua adalah lama imunisasi (hari ke - 38, 45, 52, 66, 73, 80, 87, 105, 112, 119, 126, 133, 140, 147 dan 154 pasca imunisasi). Hewan coba yang dipakai adalah kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) lokal yang pernah beranak satu kali..

Selanjutnya penelitian 5 juga dilakukan untuk menguji daya hambat fertilisasi menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial 3x6 dengan 8 ulangan. Faktor pertama adalah jenis antigen (3 macam, yaitu *Freund's Adjuvant*; *bZP3* dalam *Freund's adjuvant* dan *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant*) dan faktor kedua adalah lama imunisasi (hari ke 60, 90, 120, 150, 180 dan 210 pasca imunisasi). Hewan coba yang dipakai adalah kelinci betina (*Oryctolagus cuniculus*) lokal yang pernah beranak satu kali.

Analisis ragam digunakan untuk menguji pengaruh perlakuan terhadap profil antibodi dan nilai daya hambat fertilisasi.



Gambar 4.6. Kerangka Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN

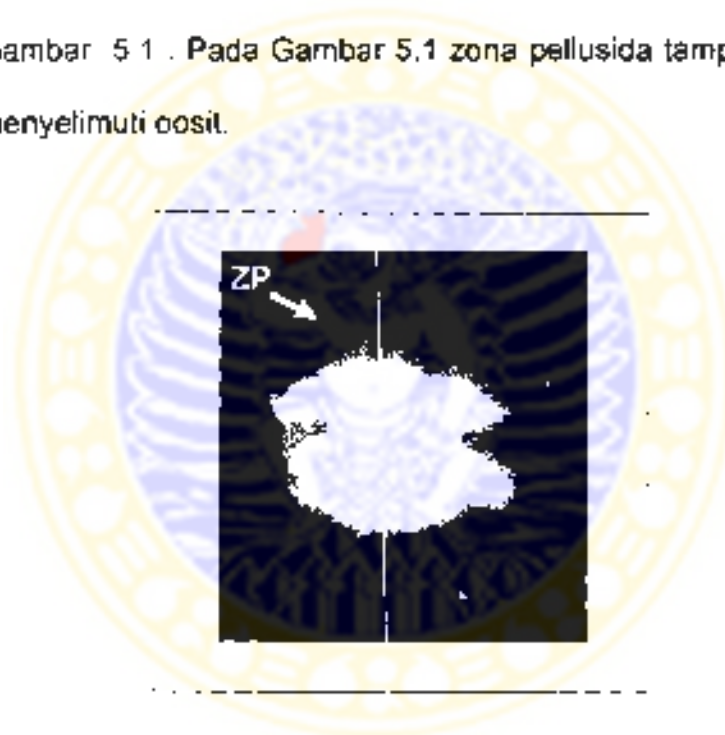
Bagian ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang relevan dengan tujuan dan hipotesisnya. Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari 5 tahap penelitian, yaitu .

1. Karakterisasi glikoprotein *bZP3*
2. Karakterisasi *bZP3dG* hasil deglikosilasi secara enzimatis dengan menggunakan enzim *N-glycanase*
3. Karakterisasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*
4. Uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*
5. Evaluasi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* sebagai penghambat fertilisasi *in vivo*.

5.1. Karakterisasi Glikoprotein *Bovine Zona Pellusida-3*

Karakterisasi glikoprotein *bZP3* bertujuan untuk memperoleh data biokimiawi meliputi kandungan protein, karbohidrat, glikoprotein, rasio pita protein yang terkandung dari *bZP* serta berat molekul *bZP3*.

Oosit hasil aspirasi yang dipakai sebagai sumber untuk melakukan koleksi zona pellusida sapi (*bZP*) adalah seperti pada Gambar 5.1. Pada Gambar 5.1 zona pellusida tampak transparan menyelimuti oosit.

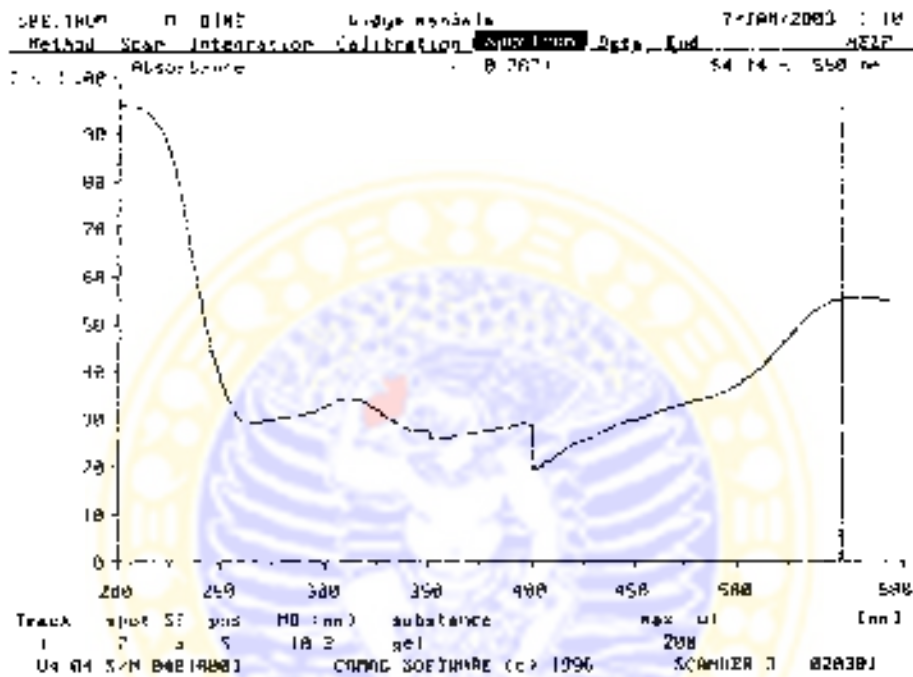


Gambar 5.1. Oosit Yang Dipakai Untuk Mendapatkan Isolat *bZP3* Dengan Pewarnaan Hoescht – Propidium Iodit (Mikroskop Inverted, Pembesaran 400 X)

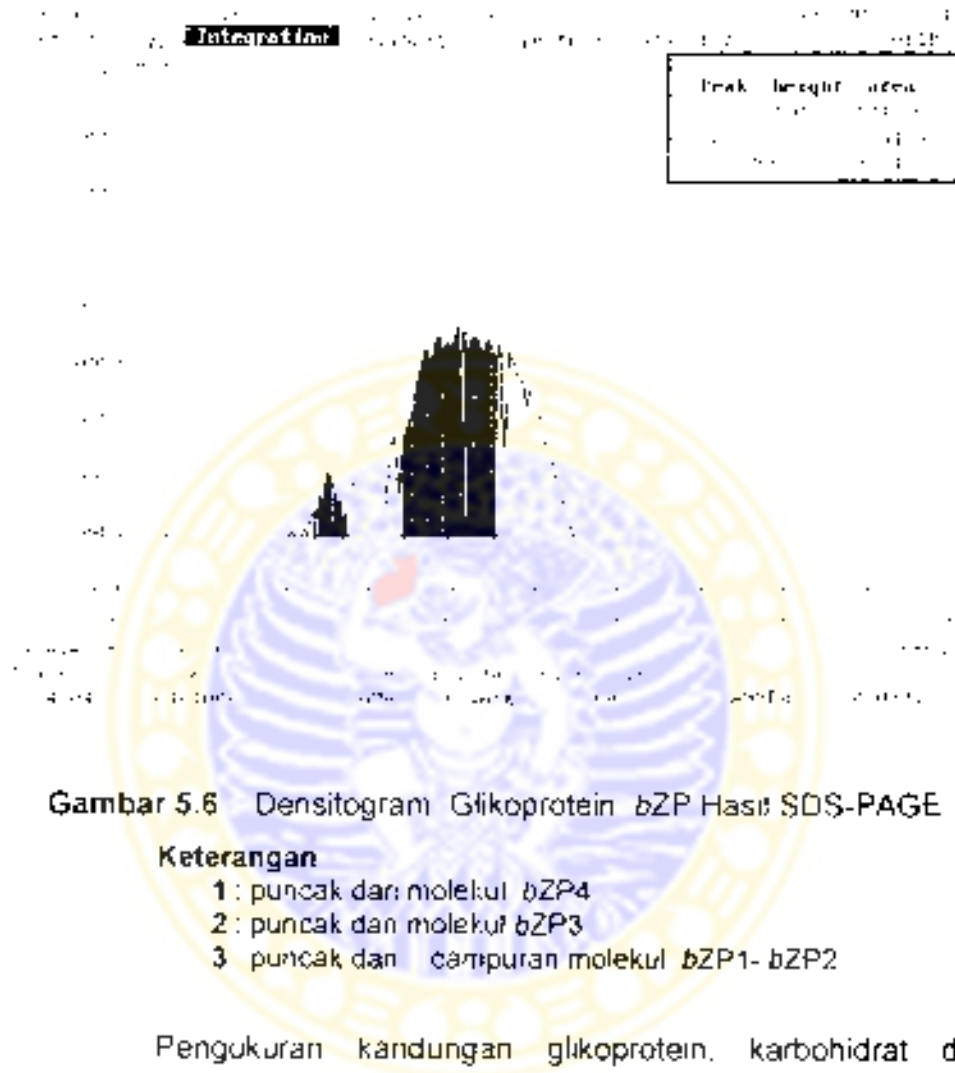
Keterangan . 1 skala mikrometer obyektif = 0,01 mm = 10 μ m

Koleksi *ZP* dilakukan melalui metode mekanik dibawah mikroskop stereo menggunakan *modified fine pipet*. Penentuan

akan dibaca pada panjang gelombang maksimumnya, seperti pada Gambar 5.5. Hasil pembacaan panjang gelombang maksimum dari gel hasil running SDS-PAGE adalah 550 nm.



Gambar 5.5. Densitogram Penentuan Panjang Gelombang Maksimum Pada Pita Glikoprotein Hasil SDS-PAGE 10 %



Gambar 5.6 Densitogram Glikoprotein *bZP* Hasil SDS-PAGE

Keterangan

- 1 : puncak dari molekul *bZP4*
- 2 : puncak dari molekul *bZP3*
- 3 : puncak dari campuran molekul *bZP1- bZP2*

Pengukuran kandungan glikoprotein, karbohidrat dan protein dari isolat *bZP* dilakukan dengan metode spektrofotometri. Data hasil pengukuran kandungan protein, karbohidrat dan glikoprotein sesuai pada Tabel 5.1

Tabel 5.1. Karakter Biokimiawi *Bovine* Zona Pellusida (*bZP*) Dan *Bovine* Zona Pellusida 3 (*bZP3*)

Rataan Kandungan dalam <i>bZP</i> ($\mu\text{g}/bZP$)	Total <i>bZP</i>	<i>bZP3</i>	Metode
Glikoprotein ($\mu\text{g}/ZP$)	$7,47 \pm 0,06$	$2,19 \pm 0,04$	Metode PAS
Karbohidrat ($\mu\text{g}/ZP$)	$3,09 \pm 0,04$	$0,91 \pm 0,04$	Metode PAS
Protein ($\mu\text{g}/ZP$)	$4,38 \pm 0,33$	$1,28 \pm 0,08$	Metode Biuret
Berat Molekul Relatif (kDa)	Ada 4 pita	$79,995 \pm 0,051$ kDa	SDS-PAGE dengan pewarna PAS

Pengukuran glikoprotein dan karbohidrat berdasarkan prinsip bahwa glikoprotein dioksidasi oleh Kalium Periodat (KIO_4) menjadi aldehyd. Selanjutnya aldehyd ini yang dideteksi menggunakan reagen PAS, sedangkan kandungan protein diukur menggunakan metode Biuret (data lengkap perhitungan pada Lampiran 3.4, 3.5 dan 3.6).

5.2. Karakterisasi *bZP3dG* Hasil Deglikosilasi Secara Enzimatis Menggunakan Enzim *N-glycanase*

Proses deglikosilasi terhadap molekul *bZP3* dilakukan secara enzimatis menggunakan enzim *N-glycanase*. Pemotongan terjadi pada rantai karbohidrat yang terikat pada natri polipeptida molekul *bZP3*, khususnya yang terikat melalui ikatan *N-linked Oligosaccharide*. Hasil molekul *bZP3* terdeglikosilasi (*bZP3dG*)

5.3. Karakterisasi Anti-*bZP3* Dan Anti-*bZP3dG* Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Immunologis Menggunakan Metode Dot Blot, Western Blot dan *indirect* ELISA

5.3.1. Uji Spesifitas Anti-*bZP3* Terhadap *bZP3* Dan Anti-*bZP3dG* Terhadap *bZP3dG* melalui *Dot Blot* Dan *Western blot*.

Uji spesifitas bertujuan untuk membuktikan bahwa *bZP3* dan *bZP3dG* mampu menginduksi anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*. Data uji spesifitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metode *Dot blot* menggunakan alat *Dot blotter* (BioRad), dihasilkan data berupa gambar visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen (*bZP3* dan *bZP3dG*; dengan antibodi terhadap *native* atau *deglycosylated bZP3* (anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*) berupa noda biru keunguan, seperti Gambar 5.8 dan Gambar 5.9. Hasil *immunoblotting* pada Gambar 5.8 dan 5.9 memperlihatkan bahwa antiserum anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* mengenali protein *ZP3* sapi Gambar 5.8 dan 5.9 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang bereaksi maka semakin gelap warna yang dihasilkan



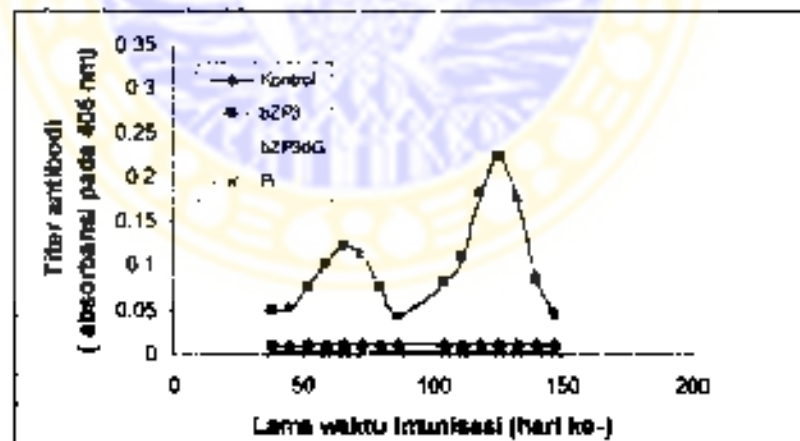
Gambar 5.8 dan 5.9 tampak ada gradasi warna noda sebagai hasil reaksi antigen (*bZP3* dan *bZP3dG*) dengan antibodi (*anti-bZP3* dan *anti-bZP3dG*). Gradasi warna ini dipengaruhi oleh variasi konsentrasi antigen dan antibodi. Pengenceran *anti-bZP3* dan *anti-bZP3dG* sampai 1/800 dapat dikenali oleh antigen (*bZP3* dan *bZP3dG*) sampai pada pengenceran 1/200.

Untuk mengetahui bahwa molekul *bZP3* dan *bZP3dG* yang mempunyai berat molekul berturut-turut adalah $79,995 \pm 0,051$ kDa dan $50,462 \pm 0,004$ kDa bereaksi spesifik dengan antibodi hasil induksinya (*anti-bZP3* dan *anti-bZP3dG*) dilakukan metode *Western blot* menggunakan antibodi konjugat (*anti-Rabbit-IgG-alkalin fosfatase*). Hasil uji *Western blot* nampak seperti Gambar 5.10 dan 5.11, *anti-bZP3dG* mengenali suatu protein *bZP3dG* $50,462 \pm 0,004$ kDa, sedangkan *anti-bZP3* mengenali *bZP3* dengan berat molekul $79,995 \pm 0,051$ kDa.

5.3.2. Uji Spesifitas Anti-bZP3 Terhadap bZP3 Dan Anti-bZP3dG Terhadap bZP3dG Melalui *Indirect* ELISA

Secara kuantitatif kemampuan bZP3 dan bZP3dG untuk menginduksi anti-bZP3 dan anti-bZP3dG diukur dengan metode *indirect* ELISA. Percobaan dilakukan dengan menyuntikkan bZP3 dan bZP3dG yang telah dicampur dengan "Compleat Freund's Adjuvant (CFA)" dan "In-compleat Freund's Adjuvant (IFA)" masing-masing untuk imunisasi primer dan sekunder dilakukan secara sub kutan kepada kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) galur Wistar

Gambar 5.12 adalah hasil titer antibodi (IgG) terhadap bZP3 dan bZP3dG pada kelompok tikus jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar.



Gambar 5.12 Profil Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Pada Kelompok Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar.

Keterangan :

Pi : serum pre-immun

5.3.2.1. Analisis Statistik Uji Spesifitas Reaksi Dengan Metode *indirect* ELISA

Hasil pengamatan nilai titer antibodi hasil induksi *bZP3* dan *bZP3dG* terlampir pada Lampiran 8. Hasil analisis titer IgG ini dilakukan untuk mengetahui apakah *bZP3* dan *bZP3dG* mempunyai profil titer IgG yang sama pasca imunisasi melalui nilai absorbansi pada panjang gelombang 450 nm.

Hasil analisis ragam pengaruh imunisasi terhadap nilai titer antibodi yang diinduksi *bZP3* dan *bZP3dG* menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$). Ringkasan hasilnya disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil Analisis Ragam Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi *bZP3* Dan *bZP3dG* Pada Kelompok Tikus Jantan (*Rattus novergicus*)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F	P
Faktor A	14	0,573	0,041	2164,7683	0,0000
Faktor B	2	0,865	0,433	22927,9434	0,0000
AB	28	0,302	0,011	572,1395	0,0000
Galat	315	0,006	0,000		
Total	359	1,745			

Keterangan :

A : waktu panen serum pasca imunisasi (15 X)

B : Jenis imunogen (3 macam, yaitu kontrol, *bZP3* dan *bZP3dG*)

Hasil analisis ragam pada Tabel 5.2. menunjukkan bahwa perlakuan imunisasi menggunakan jenis antigen yang berbeda berpengaruh sangat nyata ($p=0,0000$) terhadap nilai profil antidodi hasil induksinya. Selanjutnya hasil uji beda nyata menggunakan BNT 1% menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan dengan $p=0,01$.

Tabel 5.3. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%) Rerata Titer IgG Pada Kelompok Tikus Jantan (*Rattus novvergicus*) Yang Mendapat Imunisasi bZP3 Dan bZP3dG

Perlakuan	Rerata Nilai titer *
bZP3dG	0,1239 ^a
bZP3	0,1030 ^b
Kontrol	0,01107 ^c

Keterangan :

Nilai BNT 1 % = 0,0009283

* : Nilai rerata yang didampingi huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata $p=0,01$

Hasil uji BNT 1% pada Tabel 5.3 membuktikan bahwa hiangnya ikatan glikan pada molekul bZP3 (bZP3dG) mampu menginduksi titer IgG lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi hasil induksi molekul bZP3 terglisositasi (bZP3). Sedangkan Uji BNT 1% untuk mengetahui perbedaan titer antibodi hasil induksi bZP3 dan bZP3dG pada setiap pemanenan antibodi pasca imunisasi ditampilkan pada Tabel 5.4

Tabel 5.4. Hasil Uji Beda Nyata 1% (BNT 1%) Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Lama Imunisasi Yang Berbeda Pada Kelompok Tikus Jantan (*Rattus norvegicus*)

Hari Panen serum pasca imunisasi	Rerata Nilai titer *
126	0,1742 ^a
119	0,1455 ^b
133	0,1285 ^c
66	0,09062 ^d
112	0,08704 ^e
73	0,8446 ^f
59	0,07750 ^g
105	0,06442 ^h
140	0,06292 ^h
52	0,05962 ⁱ
80	0,05658 ^j
45	0,04842 ^k
38	0,04096 ^l
87	0,03646 ^m
147	0,03279 ⁿ

Keterangan :

Nilai BNT 1 % = 0,002076

* : Nilai rerata yang didampingi huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata $p=0,01$.

Tabel 5.4. menunjukkan bahwa nilai titer IgG berbeda pada lama imunisasi yang berbeda, dan nilai titer tertinggi dari ketiga perlakuan adalah pada hari ke 126 pasca imunisasi. Sedangkan hasil analisis interaksi antara jenis imunogen dan lama imunisasi nampak pada Tabel 5.5 dan hasil analisis BNT 1% terlampir pada Lampiran 9

Tabel 5.5. Hasil Uji Beda Nyata 1% Interaksi Jenis imunogen Dan Lama Imunisasi Pada Kelompok Tikus Janlan (*Rattus novvergicus*)

Jenis imunogen dan Lama imunisasi	Rerata Nilai titer *
C126	0,2876 a
B119	0,2432 b
B126	0,2235 c
C133	0,1981 d
B119	0,1825 e
B133	0,1787 f
C112	0,1394 g
C66	0,1386 g
C73	0,1301 h
B66	0,1221 i
C59	0,1184 j
B73	0,1116 k
B112	0,1097 k
B59	0,1027 l
C125	0,09712 m
C140	0,09450 mn
C52	0,09187 n
B105	0,08487 o
B140	0,08325 o
C80	0,08225 o
B52	0,07637 p
B80	0,07625 p
C45	0,07325 p
B45	0,06162 q
C38	0,06137 q
C87	0,05487 r
B38	0,05075 s
C147	0,04850 s
B87	0,04325 t
B147	0,03937 u
A112	0,01200 v
A73	0,01162 v
A126	0,01150 v
A59	0,01135 v
A125	0,01125 v
A87	0,01125 v
A80	0,01125 v
A66	0,01112 v
A140	0,01100 v
A119	0,01087 v
A38	0,01075 v
A133	0,01062 v
A52	0,01062 v
A147	0,01050 v
A45	0,01037 v

Keterangan

Nilai BNT 1 % = 0 003595,

A=FA , B=bZP3 dan C=bZP3dG, 126=Hari ke 126 pasca imunisasi

* Nilai rerata yang didampingi huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata p=0,01.

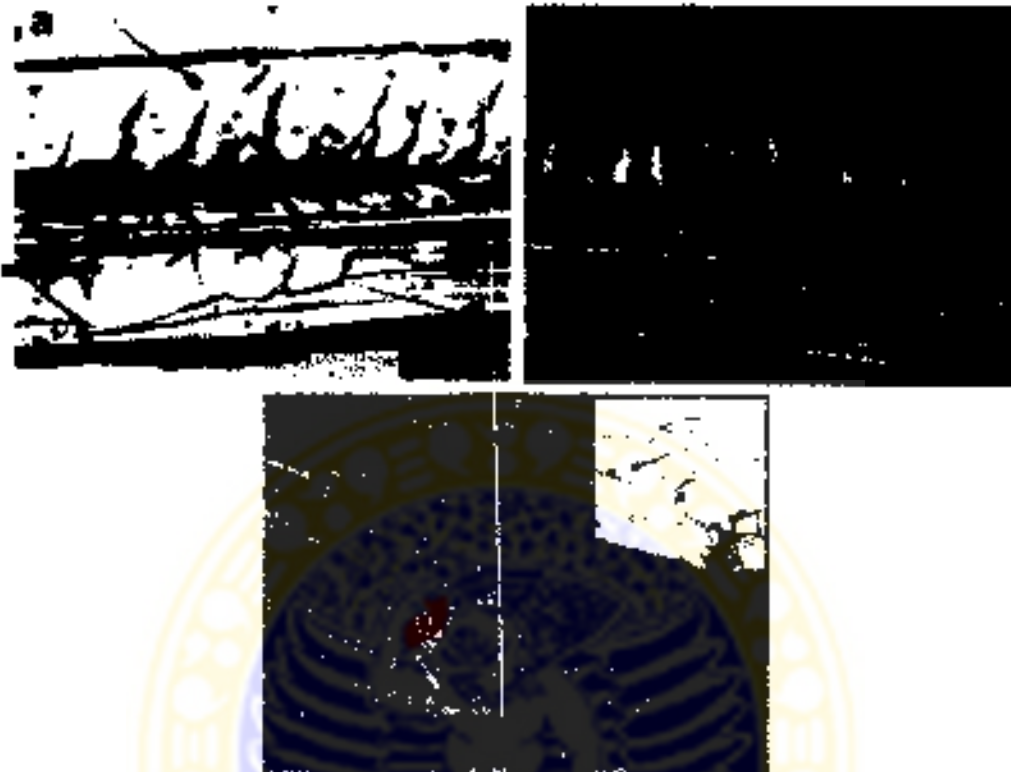
Lama imunisasi 126 hari dan jenis imunogen *bZP3dG* memberikan respon humoral terbaik berdasarkan nilai titer anti-*bZP3dG*. Kelompok hewan coba yang mendapat perlakuan kontrol yaitu imunisasi hanya menggunakan *Freund's adjuvant* memberikan respon dengan nilai minimum pada setiap variasi lama imunisasi dengan mempunyai notasi yang sama (v) pada uji BNT 1 % pada Tabel 5.5. Hal ini membuktikan bahwa kedua jenis imunogen yaitu *bZP3* dan *bZP3dG* mampu menimbulkan respon humoral optimum, pada hari ke 126 pasca imunisasi, yang diamati berdasarkan nilai OD pada panjang gelombang 450 nm melalui metode *indirect* ELISA.

5.4. Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-*bZP3* Dan Anti-*bZP3dG*

Uji pengikatan reseptor spermatozoa pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sejauhmana antibodi hasil induksi *bZP3* dan *bZP3dG* mampu menghambat fungsi reseptor primer spermatozoa. Gambar 5.13 dan 5.14 adalah hasil konfirmasi gambaran pengikatan reseptor spermatozoa menggunakan spermatozoa sapi dengan pewarnaan *Commase Brilliant Blue G-250* (Modifikasi metode dari Loeser and Tulsiani, 1999) Gambar ini diperoleh dengan pengamatan di bawah mikroskop melalui pengumpulan data gambar menggunakan kamera digital dan disimpan sebagai *file JPG* menggunakan perangkat lunak Adobe

Photoshops melalui komputer menggunakan program *AverTVmedia*. Spermatozoa berwarna biru oleh keberadaan pewarna *Commisie Brilliant Blue G-250*. Interaksi antara *bZP3* dengan spermatozoa pada dasarnya terhambat pada saat anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* ditambahkan pada *bZP3* dan *bZP3dG* (Gambar 5.13b dan 5.14b). Hal ini mengindikasikan bahwa imunogen ini dikenali secara spesifik oleh antibodinya.

Hasil uji pendahuluan dihasilkan bahwa dosis reseptor mempengaruhi jumlah spermatozoa yang terikat, selanjutnya dengan variasi antibodi juga mempengaruhi jumlah spermatozoa yang berikatan dengan molekul *bZP3* yang dilapiskan pada *plate* yang terdiri dari 6 well. Semakin tinggi dosis antibodi yang dipakai semakin berkurang jumlah spermatozoa yang terikat pada konsentrasi molekul reseptor dan sel spermatozoa yang konstan. Dosis antibodi yang dipakai adalah 1:100; 1:200; 1:400; 1:600; 1:800 dan 1:1000. Secara umum pemberian anti-*bZP3* maupun anti-*bZP3dG* menurunkan angka pengikatan reseptor spermatozoa.



Gambar. 5.13. Peran Anti-bZP3 Dalam Uji Penghambatan Pengikatan Reseptor Spermatozoa

Keterangan

Gambar a : Spermatozoa menempel pada reseptornya (bZP3) (Pembesaran 100 x)

b : Spermatozoa menjauh dari bZP3 dengan kehadiran anti-bZP3 (pembesaran 100 x).

c : Penempelan spermatozoa pada reseptornya (Pembesaran 400 x)

➔ : Molekul bZP3 yang dilapiskan pada pada *glass slide* setelah Pewarnaan CBB G-250

1 skala mikrometer obyektif = 0,01 mm = 10 μ m

5.5. Evaluasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Sebagai Penghambat Fertilisasi *In Vivo*

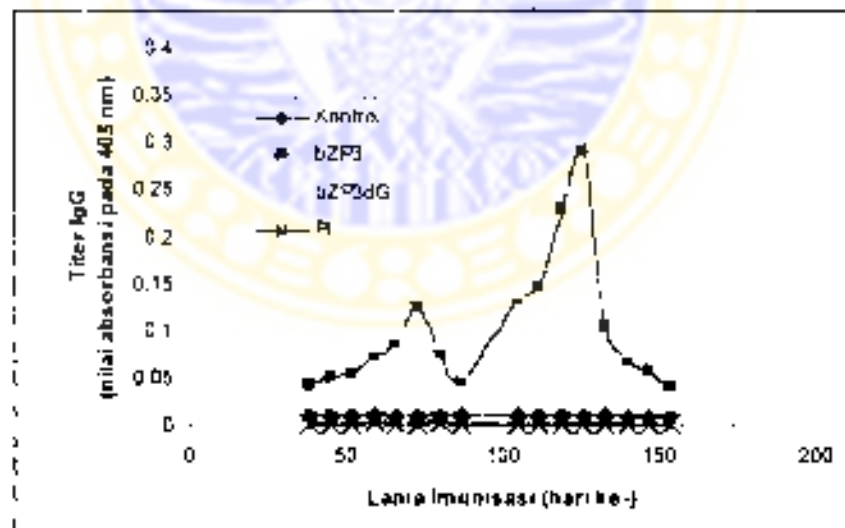
Penelitian tahap ini bertujuan untuk membuktikan bahwa bZP3 dan bZP3dG adalah munogen yang mampu menghambat proses fertilisasi *in vivo* pada kelompok kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) lokal, sehingga parameter yang diamati adalah titer anti-bZP3 dan anti-bZP3dG; penghambatan proses fertilisasi serta kembalinya fertilitas pasca imunisasi.

Kelompok 1 Kelompok hewan coba kontrol, yaitu hanya menerima imunisasi *Freund's adjuvant* (CFA dan IFA). Semua hewan pada kelompok ini memberikan respon terhadap imunisasi dengan perkembangan titer antibodi anti-bZP3 dan anti-bZP3dG sangat rendah, yaitu ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang rendah berkisar antara 0,009 – 0,015 (Lampiran 10). Hasil *flushing* embrio ditemukan adanya embrio pada tahap morula pada semua waktu pengamatan (Lampiran 6 dan Gambar 5.17.)

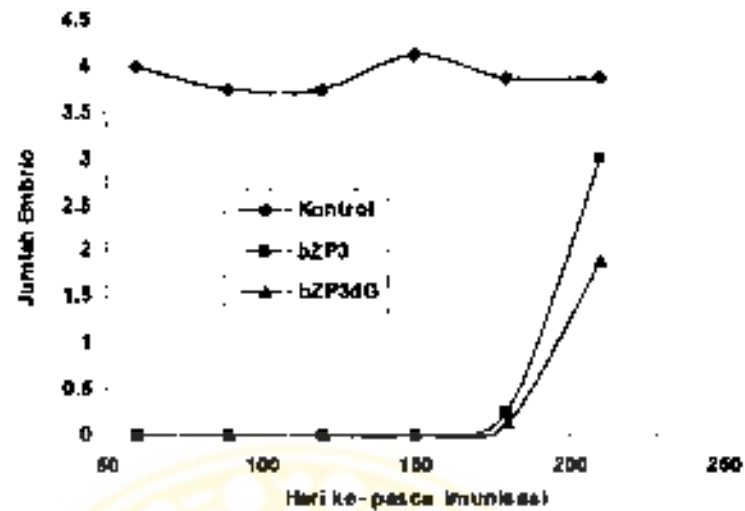
Kelompok 2. Kelompok yang mendapat imunisasi molekul bZP3 dalam *Freund's adjuvant* (CFA dan IFA) menunjukkan adanya respon terhadap imunisasi dengan pembentukan anti-bZP3 yang diukur melalui metode *indirect* ELISA (Gambar 5.15 dan Lampiran 10). Titer anti-bZP3 tertinggi dicapai pada hari ke 126 pasca imunisasi dengan nilai absorbansi $0,2929 \pm 0,0102$. Kelinci tetap infertil selama 150 hari, dan awal

bulan ke enam (180 hari pasca imunisasi *booster* 1 atau 90 hari pasca *booster* ke 2). dua ekor dari 8 ekor kelinci yang mendapat imunisasi *bZP3dG* selama 180 hari ini menunjukkan kembalinya fertilitas dengan ditemukannya embrio tahap morula (Gambar 5.16 data terinci dalam Lampiran 6, Tabel L.6).

Kelompok 3 Kelompok kelinci yang mendapat imunisasi dengan *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant* (CFA dan IFA). Titer anti-*bZP3dG* lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol maupun kelompok 2. Hasil analisis ragam (ANOVA) disajikan pada Tabel 5.6 dan hasil Beda Nyata Terkecil 1% (BNT 1%) disajikan pada Tabel 5.7, 5.8 dan 5.9.



Gambar 5.15. Profil Titer Anti-*bZP3* Hasil Induksi *bZP3* Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal.



Gambar 5.16. Evaluasi Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi *bZP3* Dan *bZP3dG* Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) lokal.

5.5.1. Analisis Statistik Profil IgG Hasil Induksi *bZP3* Dan *bZP3dG* Pada Kelompok Hewan Coba Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal Melalui *Indirect ELISA*

Hasil pengamatan nilai titer antibodi hasil induksi *bZP3* dan *bZP3dG* terlampir pada Lampiran 10. Hasil analisis titer IgG ini dilakukan untuk mengetahui apakah *bZP3* dan *bZP3dG* mempunyai profil titer IgG yang sama pasca imunisasi melalui nilai absorbansi pada panjang gelombang 450 nm yang akan dikaitkan dengan kemampuan penghambatan proses fertilisasi.

Hasil analisis ragam pengaruh imunisasi terhadap nilai titer antibodi yang diinduksi *bZP3* dan *bZP3dG* menunjukkan adanya

perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$). Ringkasan hasilnya disajikan pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6. Hasil Analisis Ragam Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal.

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F	P
Faktor A	15	0,914	0,061	3369,8670	0,0000
Faktor B	2	0,830	0,415	22947,1640	0,0000
AB	30	0,462	0,015	851,2125	0,0000
Galat	336	0,006	0,000		
Total	383	2,211			

Keterangan

A : Waktu panen serum pasca imunisasi (16 X)

B : Jenis imunisasi (3 macam, yaitu kontrol, bZP3 dan bZP3dG)

Hasil analisis ragam pada Tabel 5.6. menunjukkan bahwa perlakuan imunisasi menggunakan jenis antigen yang berbeda berpengaruh sangat nyata ($p=0,0000$) terhadap nilai profil antibodi hasil induksinya. Hal ini menunjukkan bahwa hilangnya ikatan glikan pada molekul bZP3 (bZP3dG) mampu menginduksi titer IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi hasil induksi molekul bZP3 terglisosilasi (bZP3). Selanjutnya hasil uji beda nyata menggunakan BNT 1% menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antar perlakuan jenis imunogen dengan $p=0,01$

Tabel 5.7. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%) Rerata Titer IgG Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Yang Mendapat Imunisasi bZP3 Dan bZP3dG

Perlakuan	Rerata Nilai titer	Notasi
bZP3dG	0,1166	a
bZP3	0,1027	b
Kontrol	0,01178	c

Keterangan :

Nilai BNT 1 % = 0.001374

Notasi : huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata $p=0,01$

Sedangkan Uji BNT 1% untuk mengetahui perbedaan titer antibodi hasil induksi bZP3 dan bZP3dG pada setiap pemanenan antibodi pasca imunisasi ditampilkan pada Tabel 5.8. dan hasil interaksi ditampilkan pada Tabel 5.9. dan analisis BNT 1% terlampir pada Lampiran 11.

Tabel 5.8. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil 1% (BNT 1%) Nilai Titer Antibodi Hasil Induksi bZP3 Dan bZP3dG Pada Lama Imunisasi Yang Berbeda Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal.

Hari ke-Panen serum pasca imunisasi	Rerata Nilai titer	Notasi
126	0,2145	a
119	0,1655	b
112	0,1055	b
105	0,09604	d
73	0,09408	d
133	0,08187	e
66	0,06579	f
80	0,05071	g
59	0,05771	g
140	0,05362	h
147	0,04692	i
52	0,04279	j
30	0,03967	jk
87	0,03812	kl
38	0,03575	lm
154	0,03375	m

Keterangan :

Nilai BNT 1% = 0,003173

Notasi : huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata $p=0,01$.

Tabel 5.9. Hasil Uji Beda Nyata 1% (BNT 1%) Terhadap Interaksi Antara Jenis imunogen Dan Lama Imunisasi Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal

Jenis imunogen dan lama imunisasi	Rerata Nilai titer	Notasi
C126	0.3390	a
B126	0.2929	b
C119	0.2540	c
B119	0.2303	d
C112	0.1575	e
B112	0.1469	f
C73	0.1442	fo
C105	0.1425	g
B105	0.1339	h
C133	0.1282	i
B73	0.1264	j
B133	0.1059	i
C66	1.08812	k
C80	3.08987	l
B66	0.08712	km
C59	0.08587	m
C140	0.08112	n
B80	0.07925	n
B59	0.07463	o
C147	0.07237	o
B140	0.06862	o
C52	0.06012	o
B147	0.05800	or
C45	0.05675	or
B52	0.05612	r
C87	0.05500	r
B45	0.05087	s
C38	0.05075	s
C154	0.04975	st
B87	0.04725	tu
B38	0.04462	u
B154	0.04112	v
A80	0.01300	w
A59	0.01262	w
A66	0.01212	w
A87	0.01212	w
A52	0.01212	w
A119	0.01212	w
A45	0.01200	w
A112	0.01200	w
A38	0.01187	w
A126	0.01175	w
A105	0.01175	w
A73	0.01162	w
A133	0.01150	w
A140	0.01112	w
A147	0.01037	w
A154	0.01037	w

Keterangan

Nilai BNT 1 % = D 003499

A = FA, B=bZP3 dan C=bZP3dG ; 126 = Hari ke- 126 pasca imunisasi

Notasi . huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan sangat nyata p=0,01

Titer tertinggi dicapai pada hari ke 126 pasca imunisasi *bZP3dG* dengan nilai rata-rata absorbansi 0,330 – 0,349. Kelompok kelinci yang mendapat imunisasi *bZP3dG* menghasilkan titer antibodi lebih besar dari kelompok kontrol ataupun yang mendapat imunisasi dengan *bZP3* (Lampiran 10). Kelompok kelinci kontrol yang mendapat imunisasi hanya adjuvan berbeda sangat nyata dengan dua kelompok lainnya yang mendapat imunisasi *bZP3* dan *bZP3dG* (Tabel 5.7, 5.8 dan Tabel 5.9).

Kelinci tetap infertil selama 150 hari pasca imunisasi pertama, baik *bZP3* dan *bZP3dG* atau 60 hari pasca booster ke-2. Satu ekor dari 8 ekor kelinci yang mendapat imunisasi *bZP3dG* selama 180 hari ini menunjukkan kembalinya fertilitas dengan ditemukannya embrio tahap morula (Gambar 5.16 , 5.17 dan Lampiran 6 Tabel L 6). Pada hari ke 210, tujuh dari 8 ekor kelinci yang mendapat imunisasi selama 210 hari kembali fertil dengan ditemukannya 15 embrio morula.

Tabel 5.10 Hasil Analisis Ragam Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi Oleh *bZP3* Dan *bZP3dG* Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F	P
Faktor A	2	45.411	22,705	461.1720	0,0000
Faktor B	5	8.156	1,631	33,1306	0,0000
AB	10	4.559	0,456	9,2602	0,0000
Galat	125	6,203	0,049		
Total	143	64.329			

Keterangan :

- A. Jenis imunisasi (3 macam, yaitu kontrol, *bZP3* dan *bZP3dG*)
 B. waktu flushing embrio pasca imunisasi (6 X)

Hasil analisis ragam pada Tabel 5.10, menunjukkan bahwa perlakuan imunisasi menggunakan jenis antigen yang berbeda berpengaruh sangat nyata ($p = 0,0000$) terhadap kembalinya fertilitas melalui data ditemukannya embrio. Hal ini menunjukkan bahwa hilangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* (*bZP3dG*) mampu menginduksi kembalinya fertilitas lebih panjang daripada molekul *bZP3* terglisilasi (*bZP3*). Sedangkan Uji BNT 1% untuk mengetahui perbedaan lama kembalinya fertilitas pada setiap pengamatan pasca imunisasi ditampilkan pada Tabel 5.11

Tabel 5.11. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil 1 % (BNT 1%) Interaksi Kembalinya Fertilitas Pasca Imunisasi Oleh bZP3 Dan bZP3dG Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal

Jenis imunogen dan lama imunisasi	Rerata Embrio	Notasi
A150	2,126	a
A60	2,086	a
A180	2,073	a
A210	2,073	a
A120	2,041	a
A90	2,041	a
B210	1,861	a
C210	1,5000	b
B180	0,8365	c
C180	0,7717	c
B60	0,7070	c
B150	0,7070	c
B90	0,7070	c
B120	0,7070	c
C60	0,7070	c
C90	0,7070	c
C120	0,7070	c
C150	0,7070	c

Keterangan :

Nilai BNT 1 % = 0,2902.

A = FA; B= bZP3dG dan C= tZP3dG

Notasi : huruf berbeda berarti berbeda sangat nyata $p=0.01$.

Hasil uji Beda Nyata Terkecil 1 % pada Tabel 5.11. menunjukkan bahwa pengaruh lama imunisasi terhadap kembalinya daya fertilitas pada perlakuan kontrol berbeda sangat nyata ($p = 0,01$) dengan kelompok yang mendapat imunisasi oleh bZP3 dan bZP3dG sampai hari ke 180 pasca imunisasi.

BAB 6

PEMBAHASAN

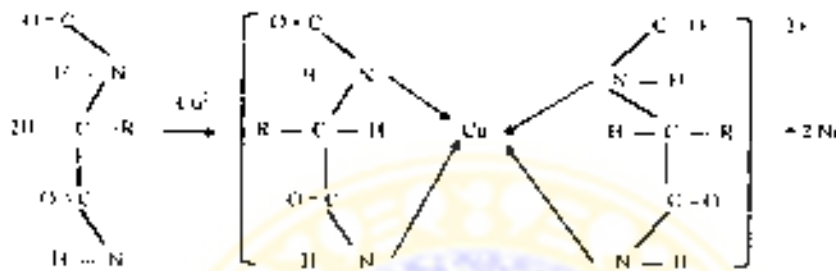
Telah dilakukan penelitian yang hasil dan analisisnya disampaikan pada Bab 5. Pada bab pembahasan ini dibahas secara berurutan berdasarkan tahapan hasil penelitian, mulai dari karakterisasi glikoprotein bZP3; karakterisasi bZP3dG hasil deglikosilasi menggunakan enzim *N-glycanase*; karakterisasi anti-bZP3 dan anti-bZP3dG melalui evaluasi spesifitas reaksi menggunakan metode *Dot blot*, *Western Blot* dan *indirect ELISA*; uji pengikatan reseptor spermatozoa dengan atau tanpa kehadiran anti-bZP3 dan anti-bZP3dG serta evaluasi anti-bZP3 dan anti-bZP3dG sebagai penghambat fertilisasi *in vivo*

6.1. Karakterisasi Glikoprotein bZP3

Molekul bZP3 diperoleh melalui metode elektrokesi. Karakterisasi biokimiawi yang dilakukan terhadap molekul bZP3 adalah mengukur kandungan glikoprotein, protein dan karbohidrat serta penentuan berat molekul dengan metode elektroforesis satu dimensi.

Pengukuran kandungan protein ZP ditentukan dengan metode Biuret, yaitu suatu metode yang didasarkan pada pembentukan kompleks yang berwarna ungu. Kompleks ini terbentuk apabila suatu protein yang mempunyai empat atom

nitrogen yang berasal dari asam amino berikatan dengan Cu^{2+} dari CuSO_4 . Menurut Walker (1994) reaksi biuret akan berlangsung sebagai berikut :



Gambar 6.1 Reaksi Biuret

Kupri Sulfat dalam suasana basa dapat bereaksi positif dengan protein, karena itu larutan yang akan diuji terlebih dahulu dibuat bersifat alkalis, dengan penambahan NaOH dalam reagen biuret. Kupri sulfat dalam suasana basa bereaksi dengan senyawa yang mengandung 2 atau lebih ikatan peptida menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna ungu. Sedangkan intensitas warna yang dihasilkan tergantung pada banyaknya ikatan peptida yang terdapat dalam protein. Hal ini sebanding dengan jumlah molekul protein total yang ada pada molekul bZP ataupun bZP3 sampel. Semakin banyak jumlah protein dalam sampel maka

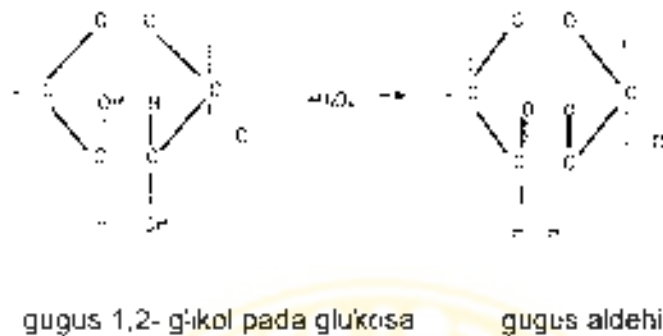
intensitas warna semakin besar karena adanya sejumlah ikatan peptida dalam sampel.

Kandungan protein dalam *bZP* ataupun *bZP3* ditentukan dengan mengkonversi serapan pada kurva BSA yang sudah diketahui konsentrasinya (perhitungan kandungan protein *bZP* di sajikan pada Lampiran 3.5 Tabel L.3.5.1.). Dari hasil penelitian dan analisa berdasarkan persamaan $Y = 5,4663 \times 10^{-3} X$, diperoleh kandungan rerata protein dari sampel adalah $4,38 \pm 0,15 \mu\text{g}$ untuk isolat *bZP* dan $1,28 \pm 0,08 \mu\text{g}$ isolat *bZP3*.

Pengukuran glikoprotein dan karbohidrat mempunyai prinsip bahwa glikoprotein dioksidasi oleh kalium periodat menjadi aldehid. Aldehid ini akan dideteksi menggunakan reagen deteksi glikoprotein yaitu pereaksi dari Fierce (no. kat 23260). Reagen deteksi glikoprotein memberikan warna ungu dengan aldehid dan mempunyai absorbansi maksimum pada $\lambda 550 \text{ nm}$. Absorbansi pada $\lambda 550 \text{ nm}$ sebanding dengan persentase komponen karbohidrat dalam glikoprotein. Hal ini dapat dibuktikan bahwa pada protein yang tidak mengandung karbohidrat seperti *lysozyme* dan BSA (pada standar) memberikan absorbansi rendah pada $\lambda 550 \text{ nm}$ (data tersebut dapat dilihat pada Lampiran 3 Tabel L.3.1).

Glikoprotein dalam sampel dapat dideteksi melalui reaksi PAS (*Periodic Acid Schiff*) yaitu suatu reaksi yang didasarkan pada efek oksidatif asam periodat (HIO_4) pada gugus 1,2 - glikol di dalam

residu karbohidrat yang menghasilkan gugus aldehid, dan dimana reaksinya dapat dituliskan sebagai berikut :



Gambar 6.2 . Reaksi PAS (*Periodic Acid Schiff*)

Isolat bZP3 mengandung karbohidrat sebesar 0.91 ± 0.04 $\mu\text{g/bZP}$, sedangkan dalam penelitian Aulanni'am, dkk. (2001) didapatkan bahwa dalam setiap molekul zona pelusida mengandung karbohidrat sebesar 3.09 ± 0.04 $\mu\text{g/bZP}$. Kandungan senyawa karbohidrat yang terukur dalam sampel menunjukkan bahwa di dalam sampel tersebut mengandung glikoprotein. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Tulsiani (2000) bahwa ZP mengandung glikoprotein yang dapat bereaksi positif dengan metode PAS. Kandungan karbohidrat pada glikoprotein sangat penting dalam hal pengenalan spermatozoa, dimana karbohidrat tersebut terikat pada rantai polipeptida melalui *N-linked* dan *O-linked oligosaccharide*. *N-linked oligosaccharide* pada beberapa mamalia merupakan bentukan *bi-*, *tri-* dan *tetra-*

antennary, sehingga berat molekul karbohidrat ini bisa mencapai 40 % dari total berat molekul glikoprotein ZP3 (Tulsiani, 2000).

Penentuan berat molekul glikoprotein *bZP* dilakukan dengan metode elektroforesis SDS PAGE menggunakan pewarnaan glikoprotein dari Pierce co. (No. Cat. 24562). Prinsip pewarnaan glikoprotein adalah terjadinya oksidasi karbohidrat yang terikat melalui ikatan proteoglikan di dalam glikoprotein menjadi aldehid dan dapat terwarnai berupa pita berwarna merah muda.

Didapatkan 3 pita pada hasil SDS-PAGE 10 % pada Gambar 5.2, yaitu pita pertama (BM 99,083 – 120,205 kDa); pita kedua (77,268 – 82,603 kDa) dan pita ketiga (53,826 kDa). Untuk menguji apakah pita glikoprotein yang paling atas terdiri dari dua pita dilakukan uji elektroforesis dua dimensi metode O'Farrell (IEF-SDS-PAGE) dengan beberapa modifikasi, diantaranya sampel glikoprotein *bZP* dilarutkan pada larutan 8.5 M urea yang mengandung 2 % ampholit, 5% mercaptoetanol serta penggunaan deterjen 1% (NP 40) (Walker, 1994). Pita dengan berat molekul 99,083-120,255 kDa, hasil SDS-PAGE 10 % seperti pada Gambar 5.2., setelah dilakukan dua dimensi elektroforesis didapatkan 2 pita, yang kemudian diidentifikasi sebagai molekul *bZP1* dan *bZP2*. Selanjutnya pita *bZP3* (79,995 ±0,051kDa) dan *bZP4* (53,836 kDa) tetap merupakan satu pita. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Kudo *et. al.* (1998) pada ZP babi (*pZP*), di mana pita pertama

dapat dipisahkan melalui metode dua dimensi elektroforesis sebagai campuran antara *pZP1* dan *pZP2*

Glikoprotein penyusun ZP babi dari hasil penelitian Hasegawa *et al.* (1994), mengandung 4 jenis glikoprotein yaitu ZP1, ZP2, ZP3 dan ZP4 dengan berat molekul antara 20 – 125 kDa. Hal ini mungkin disebabkan karena ZP1 babi dapat dipisahkan dengan menggunakan reduktor menjadi dua sub protein yaitu *pZP2* dan *pZP4* (Taya *et al.*, 1995).

Berat molekul glikoprotein ZP diantara spesies mamalia sangat bervariasi. Pada awal penelitian yang dilakukan oleh Hirsch dan Elvira (1999), ZP tikus mempunyai berat molekul antara 83-200 kDa, yang diberi nama *mZP1*, *mZP2*, *mZP3* dan *mZP4*, sedangkan hasil penelitian Brown *et al.* (1990) menunjukkan bahwa molekul glikoprotein ZP hamster mempunyai kisaran berat molekul antara 20-250 kDa dan diberi nama ZP1, ZP2, ZP3 dan ZP4

Selanjutnya melalui metode gel densitometri terhadap hasil SDS-PAGE dapat ditentukan rasio antara molekul yang terkandung dalam sampel berdasarkan tebal pita hasil elektroforesis. Analisis menggunakan alat densitometer terhadap molekul *bZP* terdeteksi adanya 3 puncak dengan luas area yang berbeda (Gambar 5.6.). Luas area puncak ke 2 (7594,9 mm) merupakan luas area untuk molekul *bZP3* dan luas area puncak 3

(9874 mm) adalah luas area untuk campuran *bZP1* dan *bZP2*. Selisih ke dua luas area ini adalah sebesar 2279.1 mm yang diasumsikan sebagai *bZP1* dari *bZP4* yang masih tergabung dalam molekul ini, sehingga dapat diasumsikan bahwa rasio molekul *bZP3* dan *bZP2* adalah 1:1. Hal ini sesuai dengan pendapat Green (1997) bahwa rasio mol protein antara *ZP2* dan *ZP3* adalah 1:1, dimana jumlah mol *ZP1* adalah 0,9% dari jumlah mol *ZP2* dan *ZP3*.

Sesuai dengan sekuen asam amino *bovine ZP3* dan data NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/107000000>) (terlampir pada Lampiran 7), *bZP3* tersusun atas 421 asam amino dan terglykosilasi melalui ikatan *N-linked oligosaccharide* pada 4 asam amino (Asparagin atau Asn) yaitu pada Asn124, Asn146, Asn179 dan Asn271. Berat molekul protein rantai polipeptida molekul *bZP3* secara perhitungan adalah 50,592 kDa, sedangkan berdasarkan hasil SDS-PAGE mempunyai berat molekul antara 50,459-50,468 kDa (perhitungan terlampir pada Lampiran 4).

6.2. Karakterisasi *bZP3dG* Hasil Deglikosilasi Menggunakan Enzim *N-glycanase*.

Molekul *bZP3dG* hasil deglikosilasi mempunyai berat molekul 50,462 ± 0.004 kDa (Gambar 5.7 dan perhitungan terlampir pada

Lampiran 4). Pada tahap penelitian ini rantai karbohidrat yang terikat melalui *N-linked Oligosaccharide* pada rantai polipeptida *bZP3* dipotong secara enzimatik menggunakan enzim *N-glycanase*. Sesuai data NCBI, molekul *bZP3* mempunyai 4 posisi *N-linked oligosaccharide* yaitu pada asam amino Asn124, Asn146, Asn 179 dan Asn271 dalam rantai polipeptida *bZP3*. Rantai karbohidrat yang terikat pada molekul *ZP3* melalui *N-linked oligosaccharide* ini dapat terjadi melalui struktur *biantenary*, *triantenary* dan *tetrantenary* (Yonezawa *et al.*, 1999; Tulsiani, 2000). Selanjutnya oleh peneliti lain dilaporkan bahwa *ZP3* babi (*pZP3*) terdapat 3 posisi *N-linked oligosaccharide* yang terdapat pada Asn 124, Asn146 dan Asn271. Bentuk *triantennary* dan *tetraantennary* hanya terdapat pada Asn271, sedangkan *diantennary* terdapat pada Asn 124, Asn146 dan Asn 271 (Kudo *et al.*, 1998 dan Yonezawa *et al.*, 1999).

Secara perhitungan berdasarkan 421 asam amino yang menyusun *bZP3*, maka molekul ini mempunyai berat molekul sebesar 50,692 kDa sedangkan berat molekul hasil SDS-PAGE adalah $50,462 \pm 0,004$ kDa. Berat molekul karbohidrat yang terkandung dalam molekul *bZP3* sebesar 30,533 kDa atau sekitar 36,92 %. Hasil penelitian Liu *et al.*, 1997 melaporkan bahwa berat molekul karbohidrat yang terikat melalui *N-linked oligosaccharide* pada tikus mencapai 44,000 kDa dari molekul utuhnya (*native*

ZP3) yaitu 94.000 Dalton. Kandungan karbohidrat sebesar 36,92 % ini masih sesuai dengan angka kisaran kandungan karbohidrat hasil peneliti lain dari beberapa kelas mamalia, yaitu mencapai sampai setengah dari berat molekul glikoprotein (Tulsiani, 2000). Adapun persentase ikatan glikan ini adalah 70-75 % untuk *N-linked oligosaccharide* dan 25-30 % berturut-turut untuk *O-linked oligosaccharide* (Liu et al., 1997)

6.3. Karakterisasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG Melalui Evaluasi Spesifitas Reaksi Immunologis Menggunakan Metode *Dot Blot*, *Western Blot* Dan *indirect ELISA*

Uji spesifitas antara glikoprotein bZP3 dengan anti-bZP3 serta protein bZP3dG dengan anti-bZP3dG dilakukan melalui uji *Dot blot* dan *Western blot* serta *indirect ELISA*. Data uji spesifitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metode *Dot blot* ditampilkan sebagai noda biru keunguan, seperti Gambar 5.8 dan Gambar 5.9.

Gambar 5.8 dan 5.9 menunjukkan ada gradasi warna sebagai hasil reaksi antigen (bZP3 dan bZP3dG) dan antibodi (anti-bZP3 dan anti-bZP3dG) berdasarkan variasi konsentrasi antigen dan antibodi. Molekul anti-bZP3 dan anti-bZP3dG hasil pengenceran 1/800 dapat dikenali oleh antigen dengan pengenceran 1/200. Indikator yang menunjukkan adanya reaksi

positif ini menunjukkan bahwa baik *bZP3* dan *bZP3dG* mampu menginduksi respon imun humoral yaitu dikenalnya IgG oleh penginduksinya yaitu *bZP3* dan *bZP3dG*.

Noda dengan intensitas warna yang bervariasi pada Gambar 5.8 dan 5.9 menunjukkan adanya variasi kekuatan reaksi antara antigen (*bZP3* dan *bZP3dG*) dengan antibodinya, yaitu anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG*. Gambar 5.9 mempunyai intensitas warna yang lebih kuat dibandingkan dengan Gambar 5.8. Hal ini diyakini bahwa antibodi hasil induksi molekul *bZP3* yang mengalami proses deglikosilasi enzimatis menggunakan *N-glycanase* lebih kuat dan lebih spesifik bereaksi dengan rantai peptida yang ada pada molekul *bZP3* dibandingkan dengan antibodi terhadap molekul *bZP3* yang terglykosilasi. Hal ini karena molekul *bZP3dG* tidak tertutup oleh rangkaian karbohidrat sehingga pengikatan dengan antibodi pada sisi epitopnya tidak terhalang. Disamping itu dihasilkan bahwa *bZP3dG* lebih bersifat imunogenik, yang terbukti mampu menginduksi respon imun humoral lebih baik berdasar pada nilai titer antibodi hasil induksinya dibandingkan dengan molekul *bZP3* yang masih terglykosilasi. Hasil analisis statistik juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$) terhadap nilai titer antibodi hasil induksi antara molekul *bZP3* dengan *bZP3dG*. Maka dapat diyakini bahwa hilangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* melalui proses deglikosilasi enzimatis dapat

meningkatkan imunoreaktivitas inti protein dari molekul *bZP3* terhadap antibodi hasil induksinya

Hasil uji *Western blot* pada Gambar 5.10 dan 5.11 lebih memperjelas bahwa anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* berturut-turut adalah respon terhadap induksi *bZP3* dan *bZP3dG* yang mempunyai berat molekul 79,933 kDa dan 49,526 kDa. Antisera yang ditimbulkan terhadap peptida-peptida yang terdapat pada *bZP3* maupun *bZP3dG* adalah sebagai akibat dari *conserved epitope* atau *bovine-specific ZP3 epitope*. Hasil *Western blot* ini mengindikasikan bahwa molekul *bZP3* dan *bZP3dG* berikatan secara spesifik dengan anti-*bZP3* dan anti-*bZP3dG* pada pita protein (tanda panah, pada Gambar 5.10 dan 5.11). Antisera secara spesifik mengenali *respectif peptide* yang bertindak sebagai imunogen dan tidak bereaksi silang dengan peptida kontrol. Pada Gambar 5.10 tampak bahwa anti-*bZP3* mendeteksi protein *bZP3* sebagai suatu pita dengan berat molekul 77,268 – 82.603 kDa. Protein *bZP3* dikenal memperhatikan adanya heterogenitas pada gel elektroforetik. Hal ini mungkin disebabkan oleh glikosilasi, di mana sulit untuk mengidentifikasi dan mengkaraktensasi secara akurat protein-protein ZP dengan SDS-PAGE melalui pewarnaan Comassie brilliant blue R-250.

Berdasarkan hasil uji spesifitas reaksi dengan metode *Dot blot* dan *Western blot* antara *bZP3* dengan anti-*bZP3* serta

bZP3dG dengan anti-bZP3dG menunjukkan adanya reaksi positif. Hal ini dapat diyakini bahwa data titer IgG yang terukur pada metode *indirect* ELISA pada Gambar 5.12 adalah respon dari bZP3 dan bZP3dG suatu molekul yang bersifat imunogenik dengan berat molekul $79,995 \pm 0,051$ kDa dan $50,462 \pm 0,004$ kDa.

Gambar 5.12 menunjukkan adanya perbedaan titer anti-bZP3 dan anti-bZP3dG dari hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*) yang mendapat imunisasi dengan bZP3 dan anti-bZP3dG dibandingkan dengan serum preimun ataupun serum kontrol. Nilai titer serum preimun dan kontrol tampak berupa garis datar dengan nilai absorbansi 0,002-0,003 untuk preimun dan 0,011-0,014 untuk kelompok kontrol. Sedangkan titer anti-bZP3 dan anti-bZP3dG lebih tinggi dari serum preimun dan serum kontrol.

Analisis statistik dilakukan terhadap hasil pengamatan titer antibodi pasca imunisasi dengan bZP3 dan bZP3dG yang disajikan pada Tabel 5.2. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa adanya perbedaan nilai titer IgG sangat nyata ($p=0,0000$) disebabkan oleh pengaruh imunisasi bZP3 dan bZP3dG. Demikian juga hasil uji Beda Nyata Terkecil (BNT 1%) pada Tabel 5.3 menunjukkan bahwa nilai rerata yang didampingi huruf (notasi) yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p=0,01$) terhadap pembentukan IgG selama waktu 147 hari imunisasi. Imunisasi dengan bZP3dG menghasilkan nilai rata-rata

titer lebih besar apabila dibandingkan dengan imunisasi oleh *bZP3*, yaitu 0,1239 untuk *bZP3dG* dan 0,1030 untuk kelompok tikus yang mendapat imunisasi dengan *bZP3*. Hal ini menunjukkan bahwa hilangnya ikatan glikan atau hilangnya karbohidrat yang terikat pada rantai molekul *bZP3* melalui ikatan *N-linked oligosaccharide* dapat meningkatkan titer antibodi hasil induksinya.

Hasil uji pada analisis ragam dan uji BNT 1% (Tabel 5.2, 5.3; 5.4 dan 5.5) dapat membuktikan bahwa hilangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* (*bZP3dG*) mampu menginduksi titer IgG yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibodi hasil induksi molekul *bZP3* terglisosilasi (*bZP3*). Derajat glikosilasi epitop atau sisi yang dekat dengan epitop mungkin menyebabkan suatu *steric hindrance* untuk pengikatan antibodi. 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 dan interaksi terhadap antibodinya terjadi tanpa halangan ruang.

Imunisasi *bZP3* dan *bZP3dG* pada kelompok tikus dapat meningkatkan titer IgG. Pada kelompok kontrol, didapatkan titer yang relatif kecil (1/4000), yaitu 0.011- 0.015. Keberadaan anti-*bZP3dG* dan anti-*bZP3* bertahan relatif lama sampai pada hari ke-140 (Gambar 5.12), yaitu masih lebih tinggi daripada respon hari

ke 38 pasca imunisasi dengan *tZP3dG* dan *bZP3* dengan 2 kali booster

Profil titer pasca imunisasi dengan *bZP3* dan *bZP3dG* mempunyai kecenderungan yang sama yaitu mencapai puncak setelah booster pertama dan kedua yaitu pada hari ke 73 dan 126 pasca imunisasi. Titer IgG ini bisa bertahan pada angka 0.0833 – 0.0224 sampai hari ke 140 dan pada hari ke 147 nilai titer IgG berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm adalah 0,410. Meskipun terjadi penurunan pada hari ke 147 pasca imunisasi, namun nilai titernya sampai hari ke 140 masih lebih tinggi dari hari ke 38. Hasil analisis interaksi pada kelompok yang mendapat imunisasi jenis imunogen yang berbeda dengan variasi lama imunisasi, nampak bahwa imunogen *bZP3dG* pada lama imunisasi ke 126 mampu menghasilkan nilai titer antibodi tertinggi (Tabel 5.5). Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil beberapa penelitian terdahulu, yaitu imunisasi hewan betina dengan *ZP3* murni dari spesies berbeda dapat menghasilkan antibodi terhadap *ZP3* dari hewan yang dimunisasi. Hal ini diduga disebabkan terjadinya antibodi *self reactive* yang dapat dihasilkan oleh hewan melalui imunisasi dengan antigen yang mempunyai sifat reaksi silang yang luas. Demikian juga penelitian pada mencit yang mendapat imunisasi isolat glikoprotein *ZP* dari babi (*pZP*) dapat menginduksi antisera dengan titer antibodi yang tinggi (Hasegawa

and Koyama, 1996). Penelitian yang dilakukan oleh Henderson *et al.* (1998) dengan menggunakan *pZP3* mampu menginduksi anti-*pZP3* pada hewan coba marmut. Antibodi hasil induksi oleh *pZP3* ini mampu menekan lebih dari 60 % proses *binding* antara spermatozoa dengan sel telur manusia pada fertilisasi *in vitro*. Selanjutnya pada studi *in vivo*, mampu menginduksi titer antibodi dengan konsentrasi yang tinggi (Paterson *et al.*, 2002)

Peningkatan titer pada kelompok tikus (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang mendapat imunisasi *bZP3dG* juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan Tulsian (2000) yang menunjukkan bahwa interaksi pertama antara spermatozoa dan ZP merupakan suatu proses *binding* yang kompleks yang mencerminkan interaksi antara protein permukaan spermatozoa dan ZP. Hal ini berarti bahwa reseptor protein spermatozoa pada ZP tertutup oleh suatu molekul karbohidrat yang kompleks, dimana molekul ini harus terlepas atau terhidrolisis lebih dulu oleh enzim yang dihasilkan pada tudung spermatozoa agar spermatozoa mencapai rantai protein yang merupakan reseptornya, yaitu molekul protein dari ZP3

6.4. Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG

Uji pengikatan reseptor spermatozoa pada penelitian ini menggunakan spermatozoa sapi dengan/ tanpa kehadiran anti-bZP3 dan anti-bZP3dG (Gambar 5.13 dan 5.14). Penelitian ini membuktikan adanya *receptor binding* antara spermatozoa dengan reseptornya yaitu molekul bZP3 dan bZP3dG. Gambar 5.13 dan 5.14 menunjukkan *binding* dari spermatozoa terutama terjadi pada membran bagian kepala spermatozoa. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Burkin dan Miller (2000) yang menyatakan bahwa "*zona protein binding*" terjadi pada bagian akrosom spermatozoa. Menurut Snell and White (1996) ada tiga reseptor ZP3 yang ada pada membran bagian kepala spermatozoa yang berperan penting terhadap interaksi spermatozoa dengan ZP, yaitu *galactosyltransferase*, sp56 dan P95 (zrk).

Penelitian pendahuluan untuk mengetahui bahwa terjadi *binding* bZP3 dengan ligan yang berada pada membran spermatozoa dilakukan dengan uji menggunakan variasi dosis bZP3 maupun bZP3dG sebagai reseptor primer spermatozoa, serta penghambatan yang dilakukan dengan kehadiran anti-bZP3 maupun anti-bZP3dG. Hasil yang didapat adalah semakin tinggi dosis bZP3 maupun bZP3dG maka semakin banyak spermatozoa yang terikat. Namun dengan kehadiran anti-bZP3 dan anti-

bZP3dG dengan beberapa variasi konsentrasi jumlah spermatozoa yang terikat pada bZP3 dan bZP3dG menjadi berkurang. Penyalutan reseptor ini dimaksudkan untuk menutupi (menjenuhi) reseptor yang terlibat dalam pengikatan, sehingga diharapkan terjadi efek inhibisi dari tahapan penelitian ini.

Tampak jelas bahwa bioassays yang didasarkan pada inhibisi pengikatan spermatozoa pada ZP3 dipengaruhi oleh kehadiran anti-bZP3 dan anti-bZP3dG melalui gambaran berkurangnya dan menjauhnya spermatozoa terhadap reseptornya, yaitu bZP3 dan bZP3dG. Hasil penelitian ini mampu membuktikan bahwa molekul bZP3 maupun bZP3dG sebagai imunogen mampu menginduksi respon imun humoral, yang dibuktikan dapat mengganggu binding antara ZP3 dengan ligannya pada membran spermatozoa. Selanjutnya dibuktikan bahwa antibodi hasil induksi bZP3 maupun bZP3dG ini mampu menekan pengikatan spermatozoa dengan ligannya berturut-turut sebesar 72,57 % dan 75,51 % melalui uji hambatan pengikatan reseptor dengan ligannya secara *in vitro*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian pada ZP3 yang memhasil penelitian yang dilakukan Naz dan Packianathan (2000) dan Naz *et al* (2000) dengan menggunakan sintesis peptida (*dodecamer* sekuen asam amino) yang disusun berdasarkan sekuen asam amino ZP manusia (hZP) yang diberi nama YLP12. Hasil yang didapat adalah bahwa

kehadiran kehadiran anti-YLP12 (fragmen Fab' antibodi) menghambat proses *binding* spermatozoa (bagian akrosoma) dengan reseptor, yaitu *synthetic peptide*, YLP12. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan Carmona *et al.* (2002) yaitu protein dengan berat molekul 68 kDa (P68) yang dikenal dengan nama *Arylsulfatase A (AS-A)* merupakan protein pada permukaan spermatozoa yang berikatan dengan ZP3, dan selanjutnya dikatakan bahwa AS-A merupakan ligan ZP3. Peneliti lain juga melaporkan bahwa *beta1-4-galactosyltransferase-1 (GALT-1)* yang ditemukan pada permukaan spermatozoa tikus juga merupakan ligan ZP3 (Tengowski *et al.*, 2001; Julierut *et al.*, 2002). Selanjutnya Miller *et al.* (2002) melaporkan bahwa spermatozoa tikus yang telah dihilangkan GALT-1 masih dapat melakukan *binding* ZP3, tetapi tidak mampu menginduksi reaksi akrosom. Peneliti lain melaporkan bahwa anti-GALT-1 dan anti-AS-A dapat menghambat fertilisasi, dimana GALT-1 merupakan ligan ZP3. Hal ini dibuktikan melalui uji hambatan *binding* spermatozoa oleh anti-GALT-1 pada kultur spermatozoa babi (Tengowski *et al.*, 2001; Julierut *et al.*, 2002).

Implikasi dari hasil penelitian tahap ini adalah jika spermatozoa yang berikatan pada reseptornya (*bZP3* dan *bZP3dG*) tidak disupresi secara sempurna, maka fertilisasi akan terjadi. Demikian juga tampak bahwa *bZP3* yang terdeglikosilasi (*bZP3dG*)

lebih bersifat *glass adhesive* karena hilangnya rantai karbohidrat. Hal ini mungkin disebabkan oleh *progressive cross-linking* dari zona *peptides* yang terpapar bagus pada *glass slide* dengan atau tanpa kehadiran anti-bZP3dG, dan spermatozoa terhambat untuk melakukan *binding* pada reseptornya, mungkin ini merupakan salah satu faktor.

Penelitian yang dilakukan oleh Henderson *et al.* (1998) dengan menggunakan pZP3 (*pig Zona Pellusida-3*) mampu menginduksi anti-pZP3 pada hewan coba marmut serta mampu menekan lebih dari 60 % proses *binding* antara spermatozoa dengan sel telur manusia pada fertilisasi *in vitro*. Urutan interaksi reseptor-ligan yang tepat dapat bervariasi. Hal ini tampaknya memberi kontribusi terhadap spesifitas spesies selama fertilisasi. Untuk memahami mekanisme yang mendasari *binding* ini memerlukan pengetahuan beberapa molekul yang ikut berinteraksi dan dasar struktural secara molekuler dari beberapa interaksi. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa afinitas intraseluler mungkin lebih tinggi bila antigen tidak terglykosilasi.

Imunoadsorpsi dari anti-bZP3 atau anti-bZP3dG dengan peptida pada molekul utuh (*native*) bZP3 atau protein inti dari molekul bZP3 yaitu bZP3dG menghambat proses pengikatan *binding* reseptor pada ligan, bagian akrosom spermatozoa. Hal ini sejalan dengan penelitian Hinsch *et al.* (1998) bahwa terikatnya

spermatozoa pada ZP terjadi melalui interaksi spesifik yang merupakan kunci pengatur proses fertilisasi. Plasma spermatozoa mengandung molekul yang diperlukan untuk interaksi dengan ZP3.

Hasil penelitian ini nampak bahwa terjadi hambatan *binding* dengan spermatozoa oleh kehadiran antibodi hasil induksi oleh *bZP3* dan *bZP3dG* terhadap reseptor primer spermatozoa tersebut. Untuk membuktikan bahwa hambatan *binding receptor* dengan ligannya pada membran spermatozoa didukung oleh hasil *dot blot*, *western blot* dan *indirect ELISA*, yaitu kespesifikan antara *bZP3* dengan anti-*bZP3* dan *bZP3dG* dengan anti-*bZP3dG* (Gambar 5.8; 5.9; 5.10 dan 5.11). Hal ini menandakan bahwa *bZP3* dan *bZP3dG* merupakan komplemen dari reseptor pada permukaan spermatozoa.

6.5. Evaluasi Anti-*bZP3* Dan Anti-*bZP3dG* Sebagai Bahan Penghambat Fertilisasi *In Vivo*

Imunisasi menggunakan *bZP3* maupun *bZP3dG* dengan jelas memperlihatkan adanya perbedaan imunogenesitas yang sangat nyata ($p=0.000$) antara *glycosylated* dan *deglycosylated polypeptides* (Tabel 5.7). Dosis 200 μg *bZP3* maupun *bZP3dG* menggunakan *Freund's adjuvant*, cukup dapat menghasilkan peningkatan respon antibodi (sampai pada titer 1/8000), dan dapat bertahan selama lebih dari 210 hari. *Bovine zona pellusida-3* dan

bZP3dG yang dipakai sebagai imunogen dalam penelitian ini mampu menghambat fertilisasi *in vivo*. Imunisasi primer dengan *bZP3dG*, menghasilkan suatu respon antibodi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *bZP3*. Hal ini memperlihatkan bahwa hilangnya rantai sisi karbohidrat dari *bZP3* secara signifikan ($p=0,0000$) dapat meningkatkan imunoreaktivitas inti protein dari molekul *bZP3* terhadap antibodi hasil induksinya (Tabel 5.6; 5.7; 5.8 dan 5.9). Hal ini menunjukkan bahwa hilangnya rantai karbohidrat molekul *bZP3* melalui *N-linked Oligosaccharide* mempunyai kontribusi terhadap terjadinya *steric hindrance* dari rantai peptida yang dikenali oleh antibodinya. Selanjutnya juga didapat informasi bahwa pengikatan anti-*bZP3dG* pada *bZP3* menyebabkan terjadinya *steric hindrance* dari ligan untuk terjadinya pengikatan pada *binding receptor* dari spermatozoa, sehingga tidak dapat dikenali lagi oleh reseptornya.

Analisis statistik menggunakan analisis ragam (ANOVA) dilakukan terhadap hasil pengamatan titer antibodi yang disajikan pada Tabel 5.6 menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$) antara perlakuan imunisasi dengan *bZP3* dalam *Freund's adjuvant*, *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant*, dan perlakuan kontrol yang mendapat imunisasi hanya dengan *Freund's adjuvant* terhadap nilai titer IgG. Maka selanjutnya dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT 1%) antara perlakuan pada

Tabel 5.7; 5.8 dan 5.9 menunjukkan bahwa nilai rerata yang didampingi huruf (notasi) berbeda sangat nyata ($p=0.01$) terhadap kemampuan menginduksi IgG.

Imunisasi menggunakan *bZP3* dalam *Freund's adjuvant* dan *bZP3dG* dalam *Freund's adjuvant* serta perlakuan kontrol yang mendapat imunisasi hanya dengan *Freund's adjuvant* menunjukkan hasil analisis ragam yang berbeda sangat nyata ($p=0,01$) (Tabel 5.7). Selanjutnya pada Tabel 5.8 nampak bahwa lama imunisasi ke 126 menghasilkan respon sintesis antibodi tertinggi dan pada Tabel 5.9 menunjukkan bahwa imunisasi menggunakan *bZP3dG* pada lama imunisasi 126 hari menunjukkan hasil respon antibodi tertinggi. Dengan demikian memang benar bahwa hitangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* mampu menghasilkan titer IgG lebih tinggi dibandingkan pada kelompok yang mendapat imunisasi *native bZP3*. Hal ini juga didukung hasil penelitian Mahriani (2002) bahwa kualitas kemurnian imunogen mempengaruhi proses folikulogenesis pada kelompok kelinci yang mendapat perlakuan berbagai kualitas *bZP3*.

Meskipun ada perbedaan imunogenitas antara *native glycoprotein (bZP3)* dan inti protein *bZP3dG polypeptide*, telah ditunjukkan bahwa kedua molekul tersebut memperlihatkan potensi kontraseptif pada *in vivo*. Semua kelinci memberi respon terhadap imunisasi *bZP3* maupun *bZP3dG* dengan pembentukan antibodi

terhadap *bZP3* dan *bZP3dG*. Kelinci yang menghasilkan titer antibodi yang tinggi terhadap *deglycosylated polypeptide (bZP3dG)* memperlihatkan periode infertilitas selama 210 hari. Titer antibodi tertinggi pada semua kelinci yang diimunisasi dengan *bZP3* dicapai pada lama imunisasi 126 hari, yaitu 0,279 – 0,349 dan mampu menginduksi infertilitas sampai 180 hari (Gambar 5.15 dan 5.16)

Data penelitian Mahriani (2002) yang dilakukan berdasarkan pemeriksaan histologis terhadap irisan ovarium yang terpapar oleh beberapa jenis antigen yang berbeda, yaitu *crude oosit*, *crude bZP* dan *bZP3*, dihasilkan gambaran histologis yang berbeda. Dari ke tiga jenis antigen yang digunakan hanya *bZP3* yang tidak mengganggu proses folikulogenesis. Selanjutnya apabila dibandingkan antara kontrol imunisasi dengan *bZP3* melalui pengamatan nilai rata-rata folikel (primordial, primer, sekunder dan tersier) serta corpus luteum dihasilkan nilai yang hampir sama (Lampiran 12). Sedangkan pada perlakuan imunisasi dengan *crude oosit* dan *crude bZP* menunjukkan jumlah folikel yang cenderung menurun.

Deglikosilasi terhadap molekul *bZP3* dapat memperbaiki kualitas antibodi hasil induksinya. Hal ini mengingat bahwa kontaminasi pada preparasi ZP adalah alasan primer untuk

terjadinya disfungsi ovarium yang teramati pada penelitian imunisasi yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti terdahulu

Perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$) terhadap respon induksi antibodi dan daya hambat fertilitas terlihat pada kelompok kelinci yang mendapat imunisasi *bZP3* dan *bZP3dG* (Gambar 5.16, 5.17 serta Tabel 5.6). Secara teoritis, ada alasan untuk mempercayai bahwa *zona polypeptides* mengandung epitop yang mempunyai potensi untuk menginduksi sel T terutama sifat sitotoksik pada oosit (Sun *et al.*, 1999). Hal ini mengingat imunisasi oleh antigen terlarut seperti *bZP3* dan *bZP3dG* akan ditangkap oleh sel dendritik melalui tahap endositosis yang diperantarai oleh reseptor dan dipresentasikan pada membran bersama molekul MHC kelas II. Komplek peptida-MHC kelas II kemudian dipresentasikan dengan densitas tinggi pada permukaan sel pada saat sel dendritik berdiferensiasi. Pada saat sel dendritik matang, penggantian peptida yang terikat pada MHC menjadi berkurang, dan peptida imunogenik terekspresi pada permukaan sel. Sel dendritik yang membawa antigen bermigrasi menuju kelenjar getah bening lokal melalui limfatik aferen. Sel dendritik kelenjar getah bening yang membawa antigen kemudian merangsang sel T untuk berproliferasi dan melakukan aktifitas sitotoksik (Steinman, 1999).

Mekanisme di mana induksi imunitas terhadap ZP yang menyebabkan penurunan populasi folikel primordial belum jelas.

Penelitian yang dilakukan Mahriani (2002) menggambarkan bahwa imunisasi bZP3 pada kelompok kelinci tidak berpengaruh terhadap perkembangan folikel. Hal ini sejalan dengan yang dikemukakan oleh Skinner *et al.* (1999) bahwa pertumbuhan folikuler dipertahankan di bawah umpan balik negatif terhadap populasi folikel yang sedang bertumbuh, maka suatu deplesi yang diinduksi oleh antibodi pada folikel matur dapat menyebabkan suatu akselerasi kronik pada kecepatan rekrutmen folikel primordial, sehingga pool folikel primordial akan menjadi terdepleksi secara prematur. Kemungkinan lain, patologi ovarium melibatkan suatu reaksi transien, nonspesifik, inflamasi di dalam ovarium sebagai respon terhadap adanya imunoglobulin yang berkaitan pada permukaan ZP. Peristiwa semacam ini dapat mengakibatkan adanya deplesi yang cepat dari populasi folikel primordial sebagai konsekuensi dari kerentanan *dictyate-stage oocytes* terhadap *leucocyte-derived cytokines* dan *free oxygen radicals*. Bagavant *et al.* (1994) melaporkan bahwa kera Bonnet yang mendapat imunisasi menggunakan pZP3 murni sangat efektif menghasilkan infertilitas dan tidak menunjukkan gangguan pada ovarium. Lebih lanjut juga disebutkan bahwa hasil laparoskopi menunjukkan ovarium nampak normal, perkembangan folikel dan korpus luteum yang normal, jumlah folikel tidak berkurang serta tidak ada

imunisasi bZP3dG menunjukkan kembalinya daya fertilitas dengan ditemukannya embrio fase morula pada hari ke 180 pasca imunisasi. Pada dua kelompok ini sampai pada hari ke 180 masih mampu menginduksi infertilitas sampai 87,50 % dan 75,00 %. Dan pada hari ke 210 pasca imunisasi semua kelinci yang mendapat imunisasi baik bZP3 dan bZP3dG nampak kembalinya daya fertilitas dengan ditemukannya embrio dengan metode *flushing* embrio. Dari hasil 3 kelompok kelinci ini nampak bahwa imunisasi bZP3dG mempunyai efek penghambatan fertilitas lebih besar dan lebih lama dibandingkan kelompok kelinci yang mendapatkan imunisasi oleh bZP3.

Hasil analisis statistik menggunakan analisis ragam (ANOVA) dilakukan terhadap hasil pengamatan daya hambat fertilitas berdasarkan ditemukannya embrio melalui metode *flushing* embrio disajikan pada Tabel 5.10 menunjukkan adanya perbedaan yang sangat nyata ($p=0,0000$) antara perlakuan. Imunisasi pada kelompok kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) lokal dengan bZP3 dalam *Freund's adjuvant*, bZP3dG dalam *Freund's adjuvant* dan perlakuan kontrol yang mendapat imunisasi hanya dengan *Freund's adjuvant* terhadap kembalinya fertilitas. Maka selanjutnya dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT 1%) antara perlakuan pada Tabel 5.11, menunjukkan bahwa nilai rerata yang didampingi huruf (notasi) berbeda menunjukkan respon yang

berbeda sangat nyata ($p=0.01$) terhadap kembalinya fertilitas. Infertilitas yang diinduksi oleh imunisasi dengan *bZP3dG* maupun *bZP3dG* mampu bertahan sampai 180 hari. Dengan demikian memang benar bahwa imunisasi dengan *bZP3* maupaun *bZP3dG* mampu menghambat fertilisasi secara *reversible*. Demikian juga dihasilkan bahwa hilangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* mampu mengembalikan daya fertilitas lebih lama daripada kelompok yang mendapat imunisasi *native bZP3*.



BAE 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari hasil analisis penelitian dan pembahasan dapat dibuat kesimpulan seperti yang tersebut dibawah ini :

- 7.1.1. Hilangnya ikatan glikar hasil deglikosilasi dengan *N-glycanase* menghasilkan antigen dengan BM lebih kecil dan meningkatkan spesifitas reaksi dengan antibodi hasil induksinya dibandingkan dengan *native bZP3*
- 7.1.2. Hilangnya ikatan glikan molekul *bZP3* melalui deglikosilasi menggunakan *N-glycanase* memiliki potensi imunogenik untuk menginduksi terbentuknya anti-*bZP3dG* dalam serum lebih kuat dibandingkan dengan *native bZP3*
- 7.1.3. Antibodi hasil induksi molekul *bZP3* yang terdeglikosilasi mampu menghambat pengikatan reseptor spermatozoa lebih kuat dibandingkan dengan *native bZP3* menggunakan metode uji pengikatan reseptor spermatozoa
- 7.1.4 Antibodi hasil induksi molekul *bZP3* yang terdeglikosilasi mampu menghambat fertilisasi *in vivo* secara *reversible* lebih lama dibandingkan dengan *native bZP3*.

Akhirnya berdasarkan kesimpulan yang berhubungan dengan hipotesis, maka terbukti bahwa hipotesis penelitian bahwa .

Hilangnya ikatan glikan pada molekul *bZP3* menghasilkan *anti-bZP3dG* yang lebih efektif menghambat fungsi pengikatan reseptor spermatozoa, sehingga dapat menghambat proses fertilisasi secara *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.

7.2. Saran.

Meskipun telah diketahui bahwa antibodi hasil induksi molekul *bZP3* yang terdeglisosilasi mampu menghambat pengikatan dengan spermatozoa melalui metode uji pengikatan reseptor spermatozoa dan menginduksi terjadinya infertilitas sementara, namun masih perlu dikonfirmasi lebih lanjut bagaimana perubahan struktur *bZP3* secara molekuler terjadi oleh keberacaan *anti-bZP3dG* sehingga mampu menghambat pengikatan reseptor spermatozoa.

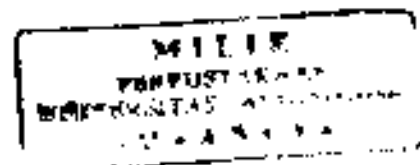
DAFTAR PUSTAKA

- Aulanni'am, Sumitro SB, Djati MS, Sutyoso dan Ciptadi G, 2001. Karakterisasi Molekul Bovine Zona Pellucida. Laporan Penelitian Hibah Bersaing IX/1 FMIPA Unibraw, Malang.
- , Sutyoso S, Susilawati T, Djati MS, Ciptadi G and Roosdiana A, 2002. The Bovine Zona Pellucida-3 : The Ratio of Protein and Carbohydrate. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies (JAFES)*. Vol 20 No 1 (Supplement), January. p. 147
- Aviles M, Castells MT, Kan FW and Ballesta J, 1996. Modification of Clectin Binding Pattern in The Rat Zona Pellucida after *In Vivo* Fertilization. *Molecular Reprod Dev.* **121**(7):1947-56
- , Jaber L, Castells MT, Ballesta J and Kan FW, 1997. Modification of Carbohydrate Residues of ZP2 and ZP3 Glycoproteins in The Mouse Zona Pellucida after Fertilization. *Biol Reprod*, Nov, **57**(5).1155-63
- Bagavant H, Fus FM, Baisch J, Kurth B, David CS and Tung KS, 1997. Immunogenicity and Contraceptive Potential of A Human Pellucida 3 Peptide Vaccine. *Biol Reprod*, Vol 56 764-70.
- Baker HW, Liu DY, Gerrett C and Martie M. 2000. The Human Acrosome Reaction. *Asian J Androl*, Sept.2(3)172-8
- Barber MR and Fayerer-Hosken RA, 2000. Possible Mechanism of Mammalian Immunocontraception. *Journal of Reproductive Immunology* **46**.103-24
- Bastiaan HS, Franken D and Wranz P, 1999. G Protein Regulation of The Solubilized Human Zona Pellucida-mediated Acrosome Reaction and Zona Pellucida Binding. *J Assist Reprod Genet.* Jul, **16**(6):332-6
- , Menkveld R, Dechninger S and Franken DR, 2002. Zona Pellucida-induced Acrosome Reaction, Sperm Morphology, and Sperm-zona Binding assessments among Subfertile men. *J. Assist Reprod Genet.* Jun, **19**(7):329-34
- Bauskin AR, Franken DR, Eberspaecher U and Donner P., 1999. Characterization of Human Zona Pellucida Glycoproteins. *Mol. Hum Reprod*, Jun, **5**(6)534-40

- Biosystem, 1999. Antibodies Practical Guide . in p . 100-101 .
- Burkin HR and Miller DJ, 2000. Zona Pellucida Protein Binding Ability of Porcine Sperm during Epididymal Maturation and The Acrosomal reaction Dev Biol. Jun 1;222(1) .99-109.
- Breitbart H and Spungin B, 1997. The Biochemistry of The Acrosome Reaction Mol Hum Reproduction. Mar;3(3).195-202
- Browis IA and Wong. 1999. Gamete Recognition : Sperm Protein that Interact with The Egg Zona Pellucida Rev reprod, Sep. 4(3) 135-42
- Carmona E, Wiraachayanuku W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M and Tanphaichitr N, 2002. Arylsulfatase A is Present on Pig Sperm Surface and is Involved in Sperm-Zona Pellucida Binding Dev Biol Jul;247(1):162-96
- Chen J, Litscher ES and Wassarman PM, 1998. Inactivation of The Mouse Sperm Receptor. mZP3 by Site Directed Mutagenesis of Individual Serine Residues Located at Combining Site of Sperm. Proc Natl Acad Scie U S A. May 26;95(11).6193-7.
- Delves P-J, Lund T and Roitt IM, 2002. Future Prospect for Vaccine to Control Fertility Trends in Immunology 23 ;4 :220-1.
- Dunbar BS; Avery S ; Lee V; Prasad SV ; Schawahn D; Schwoebel E, Skinnerr SM And Wilkins B 1994. The Mammalian Zona Pellucida Its Biochemistry Immunochemistry, molecular Biology and Development Expression Reprod Fert Develop 6 331-47
- Dunbar BS , Timmons TM, Skinner SM and Prasad SV, 2001. Molecular Analysis of a Carbohydrate Antigen Involved in The Structure and Function of Zona Pellucida Glycoproteins. Biology of Reproduction 65: 951-60
- E' Metrash M, Castle PE, Borossa G and Kan FW. 2002 Subcellular Distribution of ZP1, ZP2 and ZP3 Glycoproteins during Folliculogenesis and Demonstration of their Topographical Disposition within The Zona Matrix of Mouse Ovarian Oocytes. Biol Reprod Apr ; 66(4):866-76
- Erickson GF and Shimasaki S, 2001 The Physiology of Folliculogenesis The Role Of Novel Growth Factors. Fertility and Sterility Vol. 76 No 5 Nov .943-9

- Evan JP, 2000 Getting Sperm and Eggs together : Things Conserved and Things Diverged. *Biol Reprod.* Aug,63(2) 355-60
- Franken DR, 1988. New Aspect of Sperm-Zona Pellucida Binding. *Andrologia.* Aug-Sep,30(4-5) 263-8
- Gilbert. SF. 1994. *Developmental Biology.* 4th Edition. Sianuer Associates Inc. Publisher. Sunderland, Massachusett.
- Goer. J. 1993 *Immunochemical Techniques Laboratory Manual.* Academic Press.Harcourt Brace Javanovich, Publisher.San Diego, California.
- Gosh U and Datta K, 2003. Sperm Surface Hyaluronan *Binding Protein (HABP1)* Interacts with Zona Pellucida of Water Buffalo (*Bubalus bubalis*) Through Its Clusterec Mannose residues. *Mol reprod Dev.* Feb;64(2): 235-44
- Green DP, 1997. Three-dimensional Structure of The Zona Pellucida *Rev Reprod.* Sept ,2(3):147-56
- Grootenhuis AJ, Philipsen HL; de Breet-Grijsbach JT and van Duin M, 1996 Immunocytochemical Localization of ZP3 in Primordial Follicles of Rabbit, Marmoset, Rhesus Monkey and Human Ovaries using antibodies against ZP3. *J. Reprod. Fertill (Supple.)* 50, 43-54.
- Gupta SK, Jethanandani P, Afzalfukar A , Kaul R and Santanam R, 1997. Antibodies to Human ZP3 Induced Reversible Contraception in in Transgenic Mice with Humanized European Zonae Pellucidae. *J. Hum Rerod* 14(3): 593-600
- Hafez ESE, 2000 *Reproduction in Farm Animal,* 7th edition. Lea Febiger Philadelphia
- Hala A and Tulsiani DR, 2000 *Mammalian Sperm Acrosome : Formation, Contents and Function.* *Arch Biochem Biophys* , Jul 15;379(2):173-82
- Hardjopranto S, 1995 . *Ilmu Kemajiran Pada Temak.* Airlangga University Press.hal :21
- Hasegawa A and. Koyama K, 1996. Porcine ZP4 (Zona Pellucida) as a Candidate for Contraceptive Vaccine. *J.Mamm.Ova.Vol* 13 .1-7.

- Hinsch E, Oehringer S, Schill WB and Hinsch KD, 1999. Specificity of human and murine anti-ZP3 synthetic peptide antisera and use of antibodies for localization and identification of ZP3 or ZPC domains of functional significance. *Hum Reprod* Feb ; 14(2):419-26.
- Hinsch KD and Elvira H, 1994. Identification of Mouse ZP3 Protein in Mammalian Oocytes with Antisera Against Synthetic ZP3 Peptides. *Biology of Reproduction* 51:193-204.
- _____, 1999. The zona pellucida 'receptors' ZP1, ZP2 and ZP3. *Andrologia* 1999 Sep;31(5):320-2.
- Jackson RJ, Maguire DJ, Hind LA and Ramshaw IA, 1998. Infertility in Mice Induced by Recombinant Ectomelia Virus Expressing Mouse Zona Pellucida Glycoprotein 3. *Biology of Reproduction* , 58:152-9.
- Jovine L, Huayu Q, Zev W, Litscher E and Wassarman PM, 2002. The ZP Domain Is A Conserved Module for polymerization of Extracellular Proteins. *Nature Cell Biol.* Vol 4, June:457-61.
- Julierut T, Weerachayanukul W, Carmona E, Xu H, Anupriwan A, Michaud D and Tanphaichitr N, 2002. Role of Sperm Surface Arylsulfatase A in Mouse Sperm-Zona Pellucida Binding. *Biol Of Reprod* 67:212-9
- Kerr LE, Paterson MR and Aitken R.J, 1998. Molecular Basis of Sperm-egg Interaction and The Prospect For Contraception. *J of Reproductive Immunology* 40:103-18.
- Kiefer SM and Saling P, 2002. Proteolytic Processing of Human Zona Pellucida Protein. *Biol of Reprod* 68:407-14.
- Koolman J. and Rohm K-H, 2001. *Color Atlas Of Biochemistry* (Edisi Bahasa Indonesia oleh Wanandi SI). Penerbit Hipocrates, Jakarta, Hal . 200- 201 , 247
- Kudo K, Yonezawa N, Katsumata T, Aoki H and Nakano M, 1998. Localization of Carbohydrat chains of pig sperm ligand in Glycoprotein ZPB of Egg Zonna pellucida. *Eur J Biochem March* ; 252(3) :492-9.
- Larson JK and Miller DJ, 1997. Sperm from Variety of Mammalian Species Epress Beta 1,4-galactosyltransferase on their Surface. *Biol Reprod*, Vol 57:442-53.



- Lee VL and Dunbar BS, 1993. Development Expression of The Rabbit 55 kDa Zona Pellucida Protein and Messenger RNA in Ovarian Follicles *Developmental Biology*, **155** : 371-82.
- Lehninger AL, 1995. *Dasar-dasar Biokimia*. Jilid 1. Alih Bahasa Maggy Thenawidjaya. Penerbit Airlangga, Jakarta. hal. 87-8.
- Litscher ES, Lieu C, Echelard Y and Wassarman PM, 1999. Zona Pellucida Glycoprotein Produced in Milk of Transgenic Mice is Active as a Sperm receptor, but Can be Lethal to newborns *Transgenic Res Oct*; **8**(5):361-8
- Liu C, Litcher ES and Wassarman PM, 1997 Zona Pellucida Glycoprotein *mZP3* Bioactivity Is not Dependent on The Extent of Glycosylation of its Polypeptide or on Sulfatation and Sialylation on its Oligosaccharides. *J. Cell Sci. Mar*, 110 (pt 6) 745-52.
- Loeser CR, Lynch C and Tulsiani DRP, 1999. Characterization of the Pharmacological-sensitivity Profile of Neoglycoprotein Induced Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa. *Biology of reproduction* **61**. 629-34
- _____, and Tulsiani DRP, 1999 The Role of Carbohydrat in the Induction of The Acrosome Reaction in Mouse Spermatozoa.. *Biology of reproduction* **60**, 94-101.
- Lou, Y, Ang J, Thai H and Tung KSK, 1995 A Zona Pellucida 3 Peptide Vaccine Induces Antibodies and Reversible Infertility Without Ovarian Pathology. *J. of Immunology* **155** : 2715-20
- Mahmani, 2002. Respon imunisasi dengan Protein Zona Pellusida sapi (bZP) : Studi terhadap Histolog Ovarium Kelinci. Thesis Program Studi Biologi Molekular Reproduksi, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya., halaman 36-45
- Maloxe MBM dan Pramono CRU, 1989 Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium. PAU-Bioteknologi. IPB. Bogor. hal : 62-73 · 104 -112.
- Mate KE and Mc Cartney CA, 1998. Sequence and Analysis of Zonna Pellucida 2 cDNA (ZP2) from A Marsupial The Brushtail possum. *Trichorus vulpecula*. *Mol Reprod Dev* , Nov; **5**(3):322-9.
- Miller DJ, 1999 A Sperm's Perspective of Fertilization. *Proceeding of the American Society of Animal Science* : 1-12

- _____. Shi X and Burkin H, 2002. Molecular Basic of Mammalian Gamete Binding. *Recent Prog Horm Res.* **57**:37-73
- Morales P and Lanos M, 1996 Interaction of Human Spermatozoa with The Zona Pellucida of Oocyte : Development of The Acrosome Reaction *Frontiers in Bioscience I.* August I. **d149-60.**
- Nakano M and Yonezawa N, 2001. Localization of Sperm Ligand Carbohydrat Chains in Pig Zora Pellucida Glycoproteins. *Cells Tiss Organs* **168**:65-75
- NCBI. 2002 Sequence Viewer of Protein <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Naz RK, Zhu X and Kadam AL, 2000. Identification of Human Sperm Peptide Sequence Involved in Egg Binding for Immune Contraception. *Biol Reprod J.* **62**:318-24
- Naz RK and Packianathan JL, 2000. Antibodies to Human Sperm YLP12 Peptide that is Involved in Egg Binding Inhibit Human Sperm Capacitation/Acrosome Reaction. *Arch Androl.* Nov-Dec; **45**(3):227-32.
- Osmond JD. 1996. Adhession Molecules in Human Sperm-Oocyte Interaction Relevance to Infertility. *Frontier in Bioscience I.* **d161-76.**
- Paterson M; Wilson MR, Jenning ZA; van Duin M and Aitken RJ, 1999.. Design and Evaluation of A ZP3 peptide Vaccine in A Homologous Primate Model. *Mol Hum Reprod Vol 3, No 4*:341-52.
- _____. Jenning ZA, van Duin M and Aitken RJ, 2000. Immunocontraception with Zona Pellucida Protein. *Cells Tissues Organs* **166**(2):228-32
- _____. Jenning ZA, Wilson RW and Aitken RJ, 2002. The Contraceptive Potential of ZP3 and ZP3 peptide in Primate Model. *J of Reproductive Immunology.* **53**: 99-107.
- Patrat C, Serres C and Jouannet P, 2000. The Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Biol Cell, Jul.* **92**(3-4) : 255-66.
- Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J and Dunbar BS, 2000. Structure and Function of Protein of the Mammalian Zona Pellucida. *Cell Tissues Organs* ; **166**(2):148-64.

- Puranti SB, Laloraya M and Kumar GP, 1999 Role of Ion and Ion Channel in Capacitation and Acrosomal Reaction of Spermatozoa. *Asian J Androl.* Sept,1(3).95-107
- Rachmawati A, 2002. Induksi Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing dan Sapi dengan *Bovine Zona Pellusida-3* (*bZP3*). Thesis Program Studi Biologi Molekular Reproduksi, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya.. halaman 35-9.
- Rankin TL and Dean, J. 1996 The Molecular Genetics of the Zona Pellucida Mouse Mutation and Infertility. *Molec Hum Reprod.* 2 (11) . 889–94.
- _____. Tong, Z–B , Castle PE, Lee E, Gore-Langton, R, Nelson, LM and Dean J. 1998. Human ZP3 Restores Fertility in ZP3 Null Mice without Effecting Order Specific Sperm Binding. *Development* 125 2415–24.
- _____. Talbot P, Lee E, and Dean J. 1999. Abnormal Zona Pellucida in Mice Lacking ZP1 Result Early Embryonic Loss. . *Development.* 126 : 3847-55
- Reginald HG and Charles MG, 1996 *Biochemistry* Saunders College Publishing, New York
- Salang P and Carbaliada R 1996. Sperm-Egg Binding Protein or Proto-oncogene. *Science*, Vol 271 : 1431-4.
- Schuffner A, Bastiaan HS Duran HE Lin Z-Y, Morshedi M, Franken DR, and Oechninger S. 2002 Zona Pellucida-induced Acrosome Reaction in Human Sperm . Dependency Inactivation of Pertussis Toxin-sensitive Gi Protein and Extracellular Calcium, and Proming Effect of Progesterone and Follicular Fluid. *Molecular Human Reprod.* Vol. 8, No. 8 722-7
- Scobie GA, Gerr LE, MacDuff P and Aitken RJ, 1999. Cloning, Sequencing and Site of Origin of the Rat Sperm Receptor Protein. *ZP3 Zygote*, Feb:7(1) 27-35.
- Sinowatz F, Amselgruber W : Topfer-Petersen; Totzauer I.; Calvelette J.J , Plendl J. 1995 Immunocytochemical Characterization of Porcine Zona Pellucida during Follicular Development. *Anal Embryol* 191, 41-6.

- _____. Plendl J and Kölle S. 1998 Protein-Carbohydrate Interactions during Fertilization *Acta Anatomica* **161**:1-4:196-205.
- _____. Kollé S, Topfer-Petersen E, 2001. Biosynthesis and Expression of Zona Pellucida Glycoprotein in Mammals. *Cell Tissues Organ*, **168**(1-2): 24-35
- Shirakawa H and Miyazaki. S, 1999. Spatiotemporal Characterization of Intracellular Ca²⁺ Rise during the Acrosome Reaction of Mammalian Spermatozoa Induced by Zona Pellucida. *Dev. Biology* **208**:70-8.
- Skinner SM, Schwoebel ES, Sarvamangala VP, Mary and Bonnie SD., 1999. Mapping of Dominant B-Cell Epitope of a Human Pellucida Protein (ZP1). *Biology of reproduction* **61**:1376-80
- Steinman, RM, 1999. Dendritic cells. In (Paul WE ed.). *Fundamental Immunology*. Fourth edition, Philadelphia:Lippincott-Reven Publisher, 547-73.
- Stephen G, Castle PE and Dean J, 1999. Antibodies to Human ZP3 induce Reversible Contraception in Transgenic Mice with "Humanized " Zonae Pellucidae. *J.Human Reproduction Vol 14*, March 99 , pp. 593-600.
- Sumitro BS and Aulanni'am. 2000. Zona Pellucida 3 (ZP3) has Proper Biochemical Properties to be Considered as Candidate Antigen for Immunocontraceptive Vaccine. *The Indonesian Journal of Reproductive Science and Technology*, July 2001, **1**(1):51-3.
- _____. and Sutyoso S, Susilawati T, Djati MS, Ciptadi G dan Roosdiana A, 2001. Antibodies to Bovine Zona Pellucida (anti-bZP3) Induce Reversible Immuno Contraception in Local Rabbit and Wistar Rat, IBC Conference, Yogyakarta . 26-26 Oktober 2001 (Oral Presentation).
- _____. 2002. Bovine Zona Pellucida (bZP3) : A Candidate For Immunocontraceptive Vaccine. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies (JAFES)*, Vol 20 No.1 (Supplement), January, p: 145.
- _____. Rahayu S, Fatchiyah dan Widyarti S, 1998. Materi Kursus Teknik-teknik dasar Analisa Protein dan DNA. Jurusan Biologi, FMIPA, Unibraw, Malang, hal 25-63.

- _____ dan Susilawati, T., 1998. **Pedoman Penggunaan Mikroskop Multisistem dan Inverted**. Laboratorium Biologi. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sun W, Lou YM, Dean J and Tung KS, 1999. **A Contraceptive Peptide Vaccine Targeting Sulfated Glycoprotein ZP2 of The Mouse Zona Pellucida**. *Biol Reprod*. Apr,60(4):400-7.
- Talbot P., Shur BD and Myles DG. 2003. **Cell adhesion and fertilization: Steps in oocyte transport, sperm-zona pellucida interaction, and sperm-egg fusion**. *Biol of Reprod* 68, 1-9
- Taya T., Yamasaki N., Tsubomoto H., Hasegawa A. and Koyama K. 1995. **Cloning of cDNA Coding for Porcine Glycoprotein ZP1 and Its Genomic Organization**. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 207(2) : 790-9.
- Tengowski MW, Wastler MJ, Shur BD and Schatten G, 2001. **Subcellular Localization of Beta,1-4-galactosyltransferase on Bull Sperm and its Function during Sperm-egg Interaction**. *Mol Reprod dev*, Feb, 58(2):236-44.
- Topfer-Petersen TE, Petrounkina SM and Hundrieser EM, 2000. **Oocyte-Sperm Interaction**. *Anim Reprod Sci*, June 2;60-61:653-62.
- Totzauer E, Kole S, Sinowatz F, Plendl J, Amselgruber W and Topfer-Petersen E. 1998. **Localization of Zona Glycoprotein ZPB (ZP3 alpha) and ZPC (ZP3 beta) in Bovine Ovary during and Postnatal Development** *Anat Anz*, Feb,180(1):37-43.
- Tulsiyani DRP, 2000. **Structural Analysis of Asparagine-linked Glycan Units of ZP2 and ZP3 Glycoproteins from Mouse Zona Pellucida**. *Arch Biochem Biophys* Oct 15 ; 382(2): 275-83.
- Walker JM. 1994. **Basic Protein and Peptide Protocols**. Human Press. Totowa New Jersey.
- Wassarman, PM., 1999. **Mammalian Fertilization : Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion**. *Cell* 96 : 175 -83.
- _____, Jovine L and Litscher ES, 2002. **A Profile of Fertilization in Mammal**. *Nature Cell Biology*. Vol 5, February, pp:E59-64
- _____. 2002. **Sperm Receptor and Fertilization in Mammals**. 2002. *The Mount Sinai Journal of Medicine* vol. 69 : 148 -53.

- Yao, YQ, Chiu CN, Ho PC and Yang WS, 1998. Glycoprotein Present in Human Follicular Fluid that Inhibit The Zona-binding Capacity of Spermatozoa. *J.Human Reprod.* Vol 13 , 2541 – 47
- Yonezawa N, Fukui N, Kudo K and Nakano M, 1999. Localization of Neutral N-Linked Carbohydrate Chains in Pig Zona Pellucida Glycoprotein ZPC. *Eur J Biochem Feb* ; 260(1) :57-63
- Yurewicz EC, Zhang S and Sacco AG, 1993. Generation and Characterization on Site-directed antisera against an amino terminal of a 55 Kda Sperm Adhesive Glycoprotein from Zona Pellucida of Pig Oocytes. *J. Reproduction and Fertility* 96:147 -52
- Zara J and Naz RK, 1998. The Role of Carbohydrate in mammalian sperm-egg interaction : how important are carbohydrate epitopes?. *Front Biosci*, Oct 15; 3:D1028-38
- Zhao M and Dean J, 2002. The Zona Pellucida in Folliculogenesis, Fertilization and Early Development. *Rev Endocr Metab Disord.* Jan;3(1):19-26
- Zhu, X. and Naz, R.K., 1999. Comparison of ZP3 Protein Sequence among Vertebrate Species to Obtain Consensus Sequence for Immunoneutralization. *Front Biosci*, Vol 4:2115.

LAMPIRAN 1. Pembuatan Reagensia

1. Larutan NaCl fisiologis 0.9%.

Ditimbang 4,5 g NaCl, 0,03 g penicillin, 0,05 g streptomisin, dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass 50 ml kemudian dituangkan ke labu ukur 500 ml dan diencerkan sampai volume tanda batas

2. Buffer Fosfat 0,2 M pH 7

2.1 larutan NaH_2PO_4 0,2 M (BM=119,99 g/mol)

Berat NaH_2PO_4 yang diperlukan.

$$\begin{aligned} w &= \text{BM} \times M \\ &= 119,99 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ mol} \\ &= 2,3998 \text{ g} \end{aligned}$$

Untuk 100 ml larutan diperlukan 2,3998 gram NaH_2PO_4

Ditimbang 2,3998 gram NaH_2PO_4 , dilarutkan dalam akuades sambil diaduk dan dipindahkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambah akuades sampai tanda batas

2.2 larutan 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BM=267,96 g/mol)

Berat Na_2HPO_4 yang diperlukan

$$\begin{aligned} w &= \text{BM} \times M \\ &= 267,96 \text{ g/mol} \times 0,02 \text{ mol} \\ &= 5,3592 \text{ g} \end{aligned}$$

Untuk 100 ml larutan diperlukan 5,3592 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Ditimbang 5,3592 gram $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dilarutkan dalam akuades

Lanjutan lampiran 1

sambil diaduk dan dimasukkan dalam labu ukur 100 ml, kemudian ditambah akuades sampai tanda batas.

2.3 buffer fosfat 0,2 M pH 7

Diambil dengan gelas ukur 50 ml larutan 0.2 M NaH_2PO_4 , ditambah larutan 80 ml 0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan pH larutan diukur dengan pH meter hingga pH mencapai skala 7.

3. Larutan PBS (Phosphat buffer Saline) + Pen- Strep.

Ditimbang 4,0 g NaCl, 0,1 g KCl, 1.45 g Na_2HPO_4 , 0,1 g KH_2PO_4 , 0.03 g pencillin, 0,05 g streptomycin dilarutkan dengan akuades dalam beaker glass 50 ml. Kemudian dituangkan ke labu ukur 500 mL dan diencerkan sampai volume tanda batas.

4. Reagen Biuret

Ditimbang 0,15 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 0,6 g $\text{NaKC}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, dilarutkan dalam 50 mL akuades, ditambahkan 30 ml NaOH 10%, diaduk, dan diencerkan dalam 100 ml akuades steril.

5. Larutan Stok BSA 10.000 ppm

Ditimbang 1,00 g BSA, dilarutkan dalam 50 ml akuades, ditambahkan 3 tetes NaOH 3% dan diencerkan dalam 100 mL akuades steril.

6. Larutan KIO_4 10 mM

BM NaIO_4 = 214 g/mol

BM KIO_4 = 230 g/mol

Lanjutan Lampiran 1

$$\begin{aligned} \text{Konversi} &= \frac{230 \text{ g/mol}}{214 \text{ g/mol}} \times 21,4 \text{ mg} \\ &= 23 \text{ mg} \quad = 0,023 \text{ g} \end{aligned}$$

$$\text{Mol} = \frac{0,023 \text{ g}}{230 \text{ g/mol}} = 0,0001 \text{ mol}$$

$$\text{Molaritas} = \frac{0,0001 \text{ mol}}{0,01 \text{ L}} = 0,01 \text{ M} = 10 \text{ mM}$$

Ditimbang 0,023 g KIO_4 dan dilarutkan dalam 10 ml glikoprotein assay buffer. Kemudian disimpan dalam lemari es.

7. Larutan Glikoprotein Detection Reagent 0,5%

Ditimbang 0,05 g *glycoprotein detection reagent* dan dilarutkan dalam 10 mL NaOH 1N. Kemudian disimpan dalam lemari es.

9. Larutan APS (Ammonium persulfat) 10 % (w/v)

Ditimbang 0,5 g ammonium persulfat dan dilarutkan dengan 5 mL akuades, divortex kemudian disimpan pada suhu 4 °C.

10. Larutan Poliakrilamida T- Akril

Ditimbang 2,92 g akrilamida dan 0,08 g bisakrilamida, dilarutkan dengan 7 ml akuades dengan menggunakan pengaduk magnetik, kemudian diencerkan dalam 10 mL akuades steril.

11. Larutan Upper Gel Buffer (pH 7,0)

Ditimbang 0,75 g Tris dan 0,04 g SDS, dilarutkan dengan 5 ml akuades, ditambahkan HCl sampai pH 7. Kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril.

*Lanjutan lampiran 1***12. Larutan Lower Gel Buffer (pH 7,0)**

Ditimbang 1,82 g Tris dan 0,04 g SDS, dilarutkan dengan 5 mL akuades dan ditambahkan HCl sampai pH 7. Kemudian diencerkan dalam 10 mL akuades steril.

13. Running Buffer

Ditimbang 3,03g Tris, 14,4 g glisin dan 1,0 g SDS , kemudian dilarutkan dalam 1liter akuades steril.

14. Larutan Running Sampel Buffer (RSB)

Di ambil dengan mikropipet 1,0 mL 62,5 mM Tris HCl pH 6,8, 1,6 ml 10% gliserol, 1,6 ml 2% SDSi, 0,4 ml 5% merkaptoetanol dan 0,2 ml 0,1% bromofenol blue, kemudian diencerkan dalam 8 ml akuades steril.

15. Penyiapan Larutan Separating Gel 12 % dan 10 % serta Stacking Gel 3%**Tabel L.1. 1 Komposisi Larutan Separating Gel 12 % (1 plate)**

Bahan	12 % Volume (μ l)	10 % Volume (μ l)
LGB	1300	1500
T - akril	2000	1987,5
dd H ₂ O	1700	2510
APS 10%	80	30
TEMED	8	15

Tabel L.1.2 Komposisi Larutan Stacking Gel 3% (1 plate)

Bahan	Volume (μ l)
UGB	415
T- akril	267
dd H ₂ O	975
APS 10%	20
TEMED	2

16. Penyiapan Gel Isoelektrik fokusing (2 ml)

Bahan	Jumlah
Urea (8,5 M)	1,02 gram
Poli (30% akrilamid, 1,5 % bis)	266 μ l
dd H ₂ O	1000 μ l
Ampholit 4-7	10 μ l
Ampholit 3.5-9.5	30 μ l
APS	5 μ l
TEMED	2 μ l

17. Larutan Staining

Ditimbang 0,25 gram *Coomassie Brilliant Blue R-250* ditambah 45,4 mL metanol absolut; 9,2 ml asam asetat glasial dan akuades sampai 100 ml.

18. Larutan Destaining

Diambil dengan gelas ukur 7 ml asam asetat glasial dan 7 ml metanol absolut ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambah akuades sampai tanda batas.

Lanjutan lampiran 1

19. Larutan NaOH 1 N

Ditimbang 1,00 g NaOH dan dilarutkan dalam 10 ml akuades.

Kemudian diencerkan dalam 25 ml akuades steril

20. Pembuatan Larutan NaOH 10%

Ditimbang 1,00 g NaOH dan dilarutkan dalam 7 ml akuades

Kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril

21. Larutan NaOH 3%

Ditimbang 0,3 g NaOH dan dilarutkan dalam 7 ml akuades.

Kemudian diencerkan dalam 10 ml akuades steril

22. Saturated Ammonium Sulfat 50 % (SAS 50 %)

Ditimbang 31,4 gram $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dilarutkan dalam akuades sambil diaduk dan dipindahkan dalam tabung ukur 100 ml kemudian ditambah akuades sampai tanda batas.

23. Blocking Buffer

Ditimbang 2,5 gram susu tanpa lemak dan ditambah PBS sampai 50 ml

24. PBS - Tween 20 0,05 %

Dipipet dengan mikropipet 0,05 ml Tween 20 dan ditambah PBS sampai volume 100 ml.

25. Tris Buffered Saline (TBS)

Ditimbang 2,175 gram NaCl dan 0,3025 gram tris base, dilarutkan dalam 200 ml akuades dan diatur pHnya sampai 7,4.

Lanjutan lampiran 1

Apabila larutan bersifat basa, ditambah dengan HCl 0,1 N dan apabila larutan bersifat asam, ditambah dengan NaOH 0,1N. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan akuades sampai volume 1 liter

26. Natrium azida 0,02 %

Ditimbang 0,002 gram natrium azida, dilarutkan dalam + 5 ml akuades, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 10 ml dan ditambah akuades sampai tanda batas.

27. Pembuatan Medium *Bracket and Oliphant's* (BO) Stok

Medium BO Stok

Bahan	Komposisi (mM)	Jumlah (gram/liter)
NaCl	112	6,55
KCl	4,02	0,3
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0,83	0,113
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,52	0,106
CaCl ₂ 2H ₂ O	2,25	0,33
NaHCO ₃	37	3,104
Penicillin	-	0,06
Streptomycin	-	0,1

Semua bahan dilarutkan secara berurutan kedalam 1000 ml *deionized water* steril agar menghasilkan medium yang jernih. Medium disimpan dalam *refrigerator* untuk stok selama 3 bulan

28 Pembuatan Pewarna CBB G-250

15 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan dalam 10 ml asam perklorat 3,5 %. kemudian disaring dengan kertas whatman No.1

Lanjutan lampiran 1

29. Tabel Komposisi Protein Standar produksi Bio-Rad

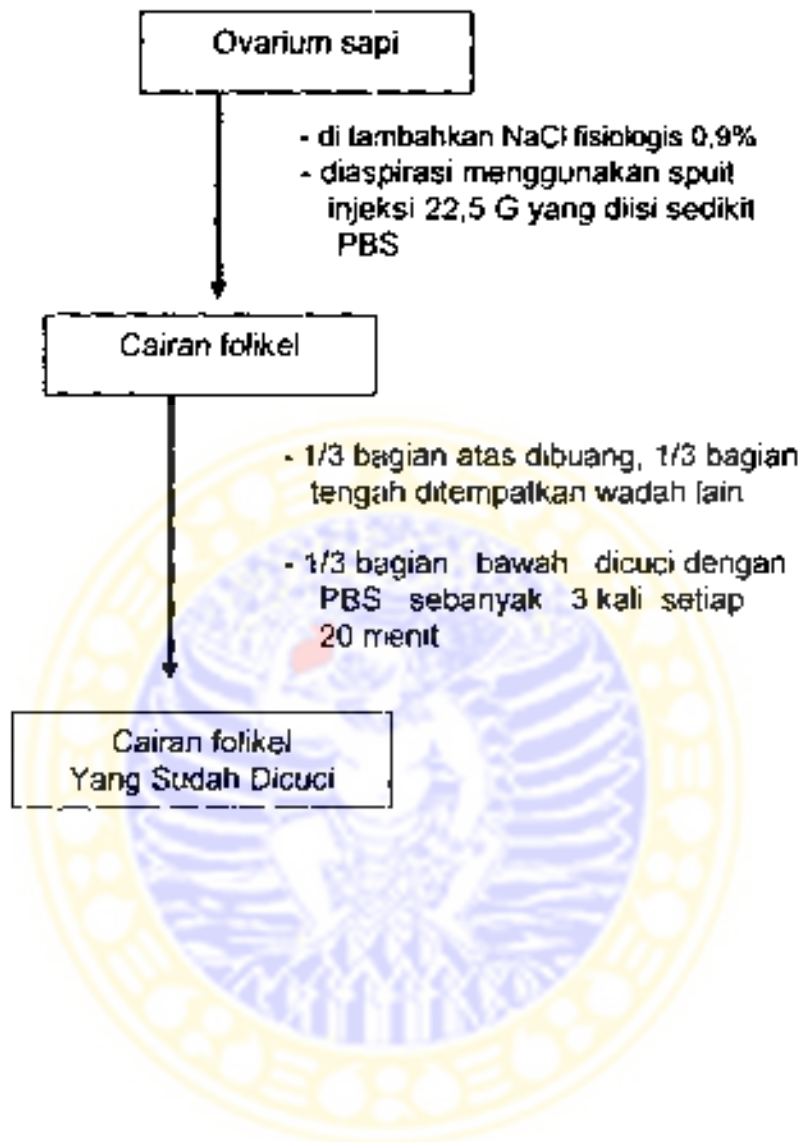
Protein	Berat Molekul (Dalton)
<i>Rabbit skeletal muscle myosin</i>	200.000
<i>E. coli β-galactosidase</i>	116.250
<i>Rabbit muscle phosphorylase B</i>	97.400
<i>Bovine serum albumin</i>	66.200
<i>Hen egg white ovalbumin</i>	45.000
<i>Bovine carbonic anhydrase</i>	31.000
<i>Soybean trypsin inhibitor</i>	21.500



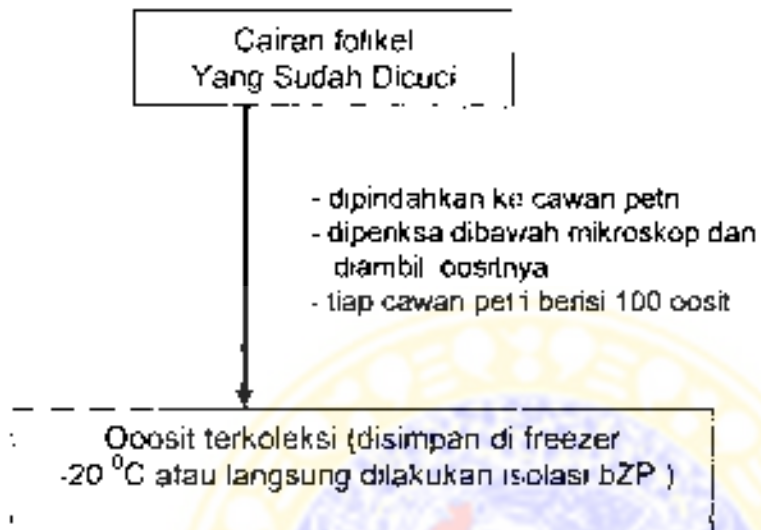
Lampiran 2. Diagram Alur Percobaan

- Lampiran 2.1 Diagram Alur Koleksi Cairan Folikel
- Lampiran 2.2 Diagram Alur Koleksi oosit
- Lampiran 2.3 Diagram Alur Isolasi Zona Pellusida Sapi
- Lampiran 2.4 Penyiapan Sampel bZP Untuk Pengukuran Kandungan Protein, Glikoprotein Dan Karbohidrat
- Lampiran 2.5 Pengukuran Protein Metode Biuret
- Lampiran 2.6 Penentuan Berat Molekul Dengan Elektroforesis SDS-PAGE
- Lampiran 2.7 Pengukuran Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat
- Lampiran 2.8 Isolasi Dan Purifikasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG
- Lampiran 2.9 Uji *Dot Blot* Terhadap bZP3 Atau bZP3dG Dengan Anti-bZP3 Atau Anti-bZP3dG
- Lampiran 2.10 Uji *Western blot* Terhadap bZP3 Dengan Anti-bZP3 Dan bZP3dG Dengan Anti-bZP3dG
- Lampiran 2.11 Uji Binding Reseptor bZP3/bZP3dG Dengan Spermatozoa Dengan Dan Tanpa Penambahan Anti-bZP3 Maupun Anti-bZP3dG

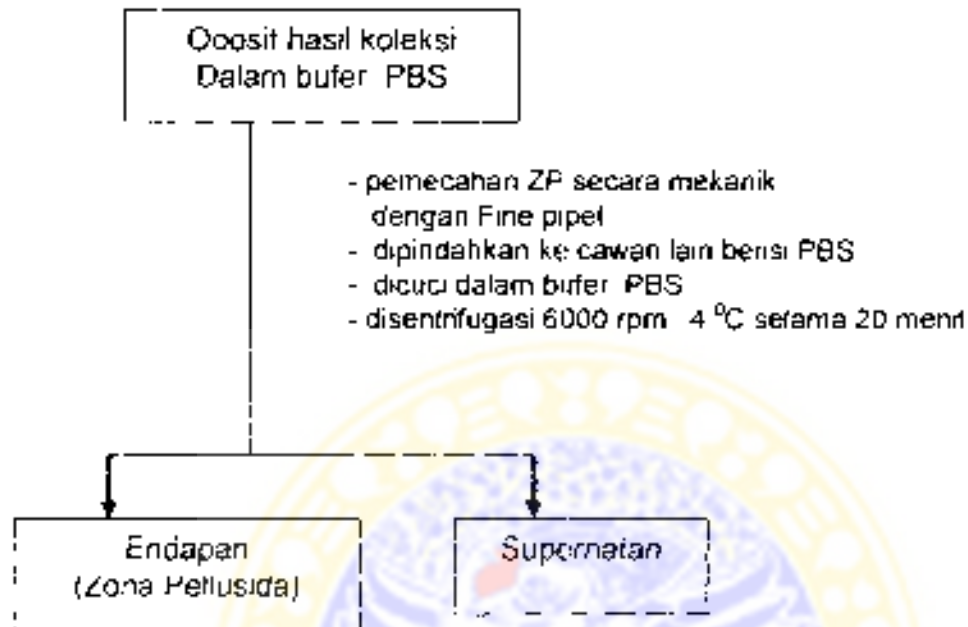
Lampiran 2. 1. Diagram Alur Koleksi Cairan Folikel



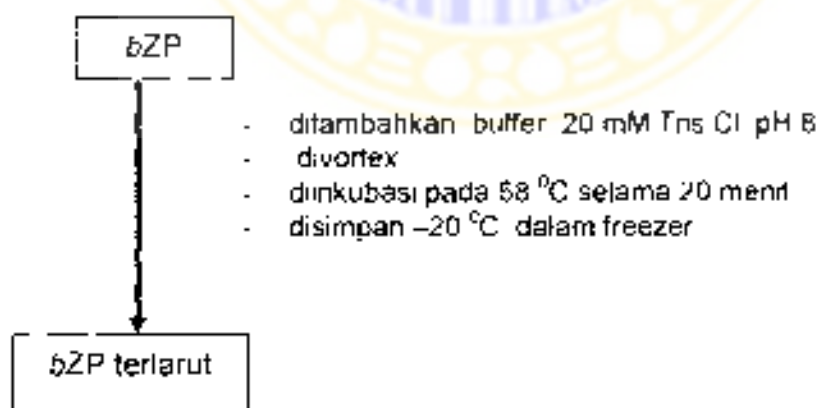
L. 2.2. Diagram Alur Koleksi oosit



L.2.3. Diagram Alur Isolasi Zona Pellusida Sapi



L.2.4. Penyiapan Sampel bZP Untuk Pengukuran Kandungan Protein, Glikoprotein Dan Karbohidrat



L.2.5. Pengukuran Protein Metode Biuret

L.2.5.1. Pembuatan Kurva Standar BSA

9 tabung reaksi diisi 1 mL larutan BSA konsentrasi 1000-9000ppm

- ditambahkan 4 mL reagen biuret + 0,5 mL air
- dikocok dan didiamkan 30 menit pada suhu kamar
- diukur serapannya pada λ maks 550 nm

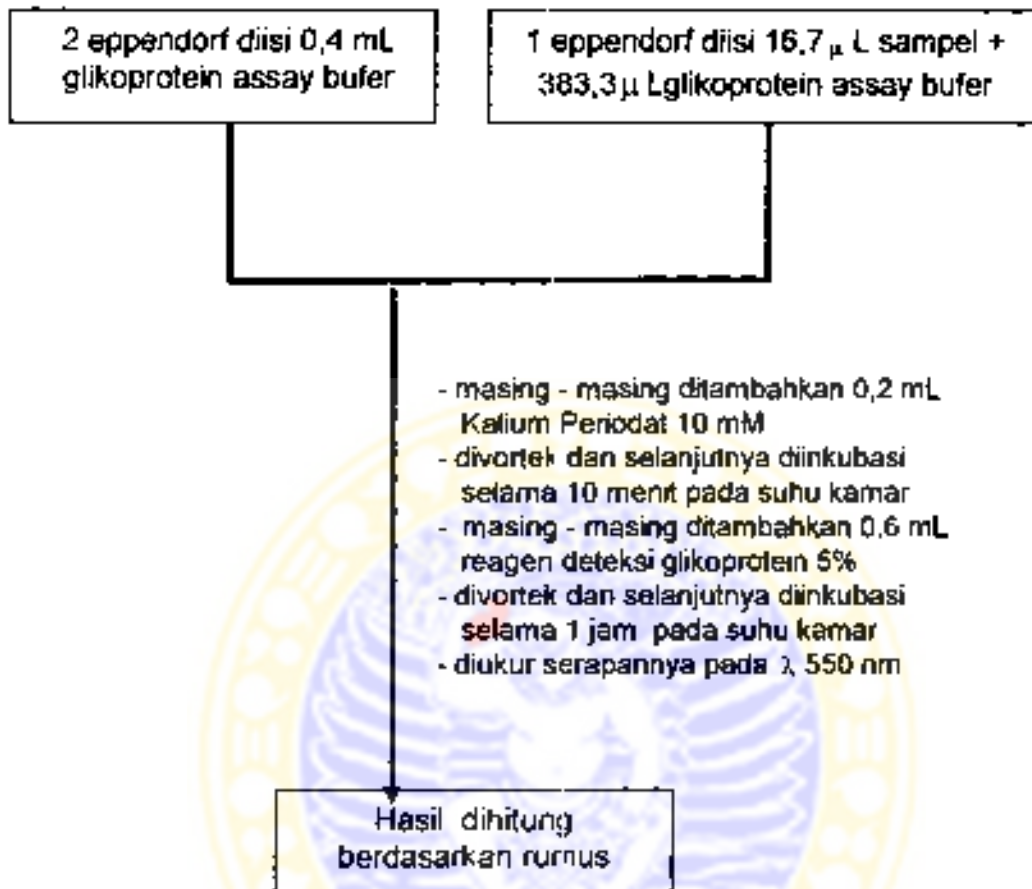
Kurva Standar BSA

L.2.5.2 Pengukuran Kandungan Protein Sampel bZP Dan bZP3

0,5 mL sampel bZP atau bZP3

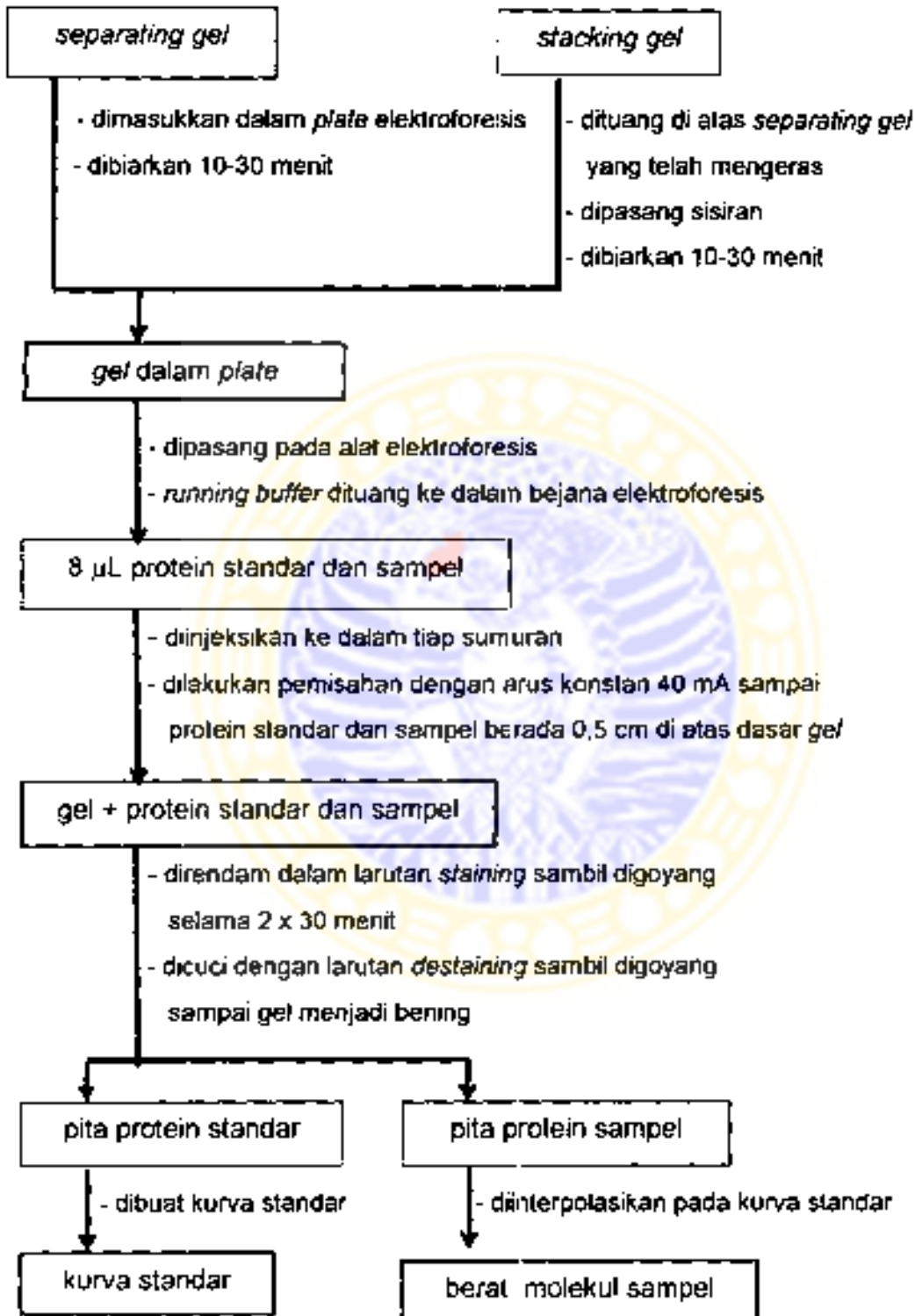
- ditambahkan 1 mL larutan BSA
- ditambahkan 4 mL reagen biuret
- dikocok, didiamkan 30 menit pada suhu kamar
- diukur serapannya pada λ 550 nm

Dihitung kandungan protein dengan menginterpolasikan dengan kurva standar BSA

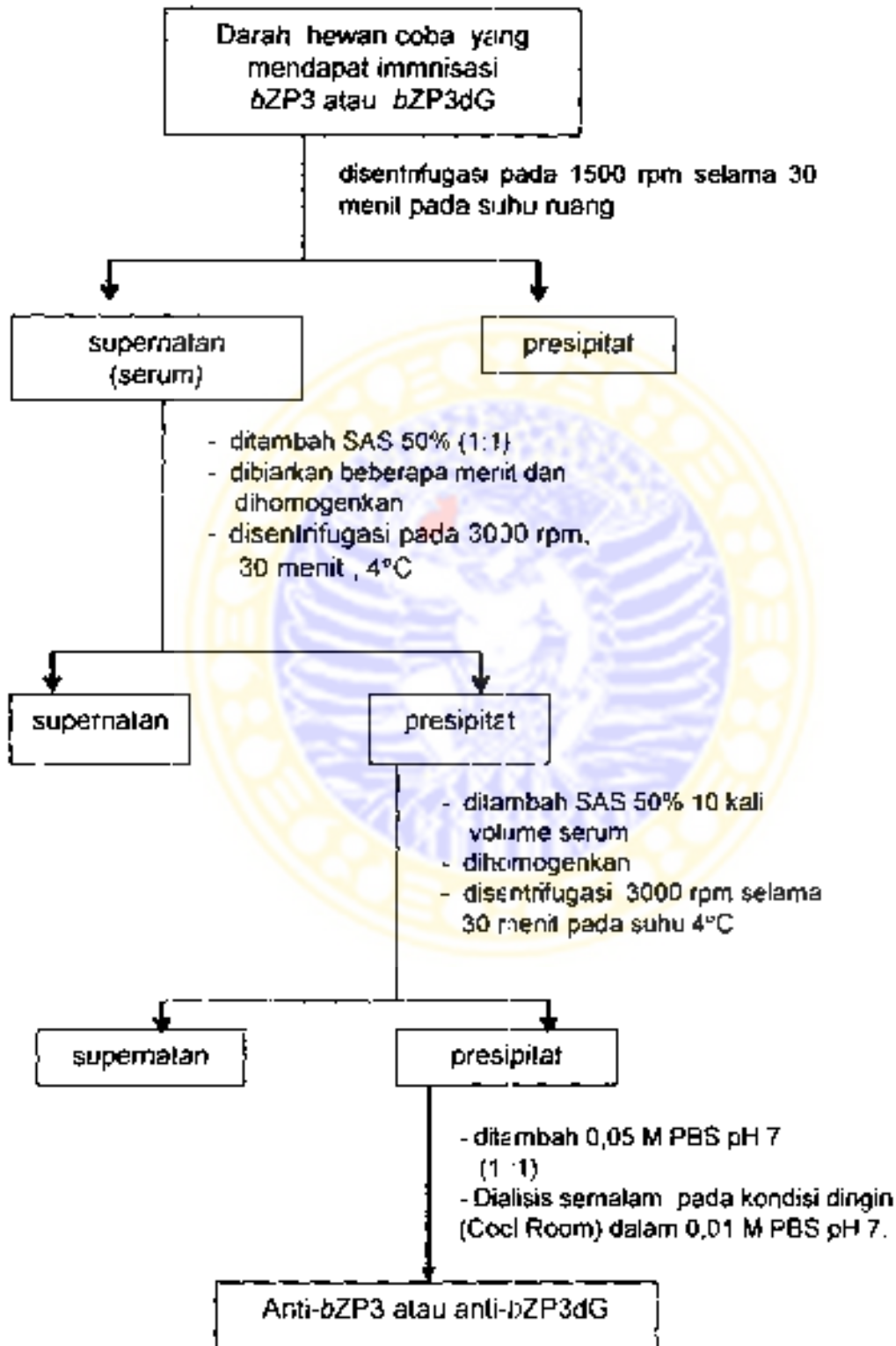
L.2.6 Pengukuran Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat

Lanjutan lampiran 2

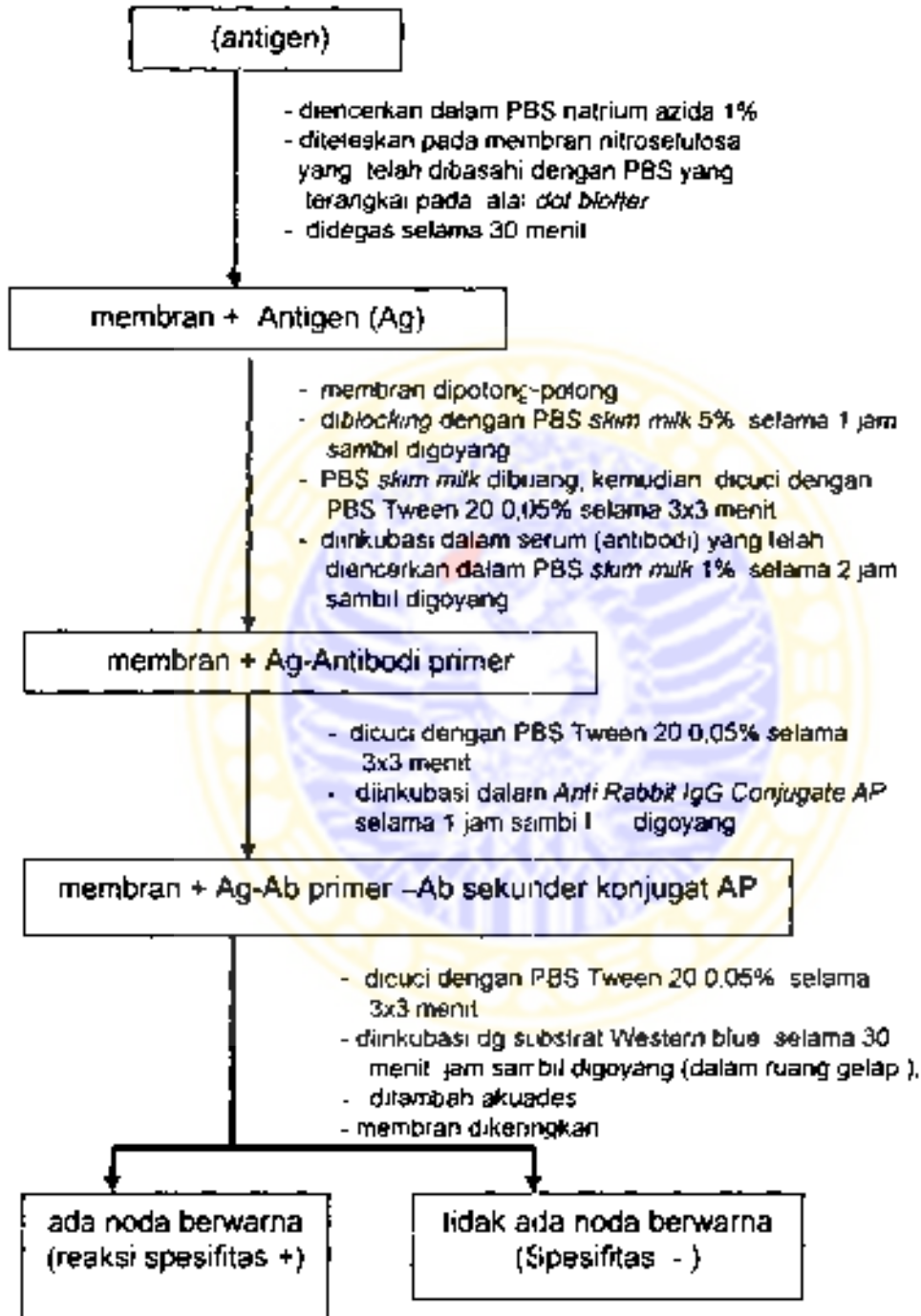
L 2.7. Penentuan Berat Molekul Dengan Elektroforesis SDS-PAGE



L.2.8. Isolasi Dan Purifikasi Anti-bZP3 Dan Anti-bZP3dG



L.2.9. Uji Dot Blot Terhadap bZP3 Atau bZP3dG Dengan Anti-bZP3 Atau Anti-bZP3dG

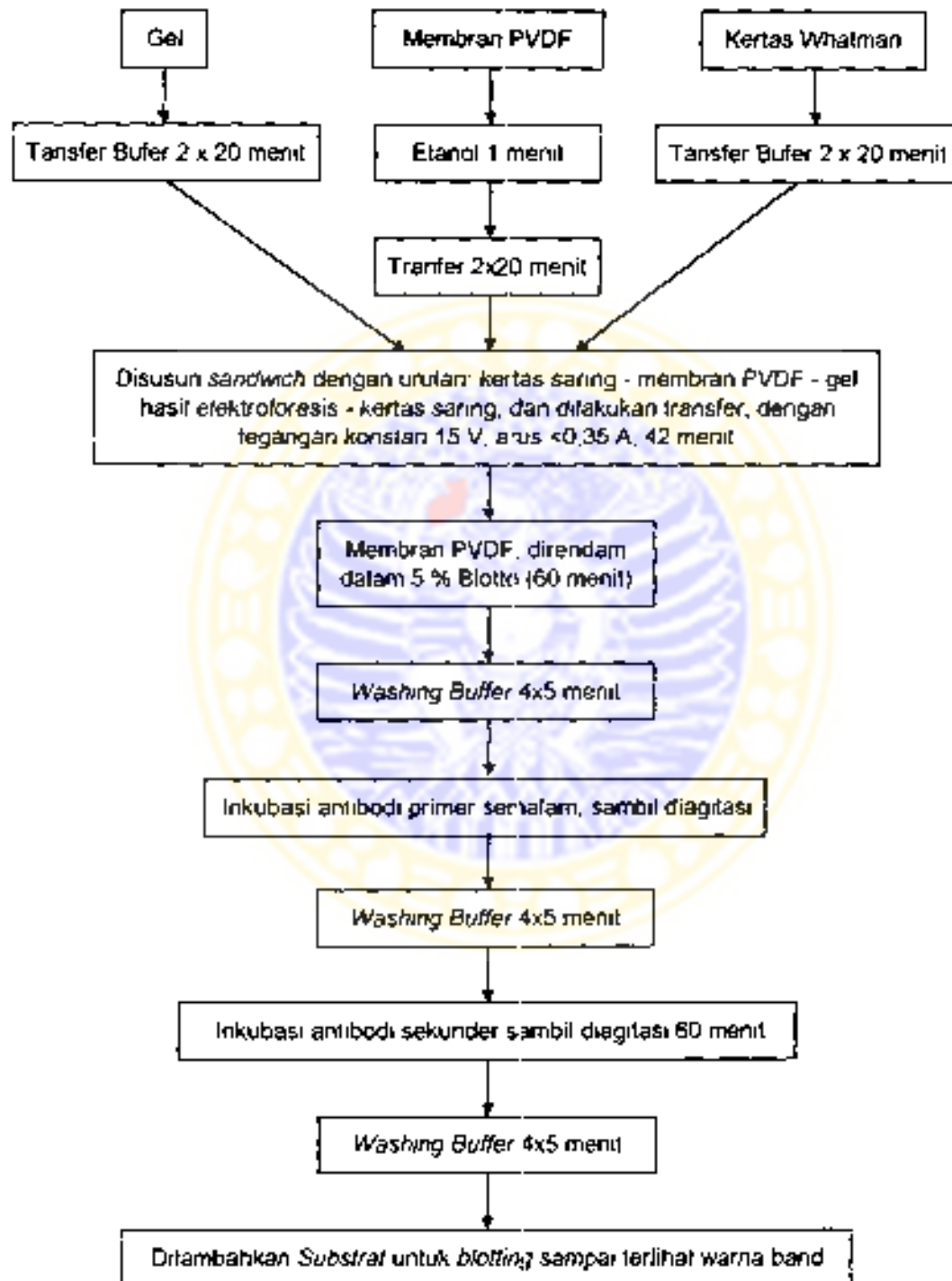


Keterangan : Antigen : bZP3 atau bZP3dG

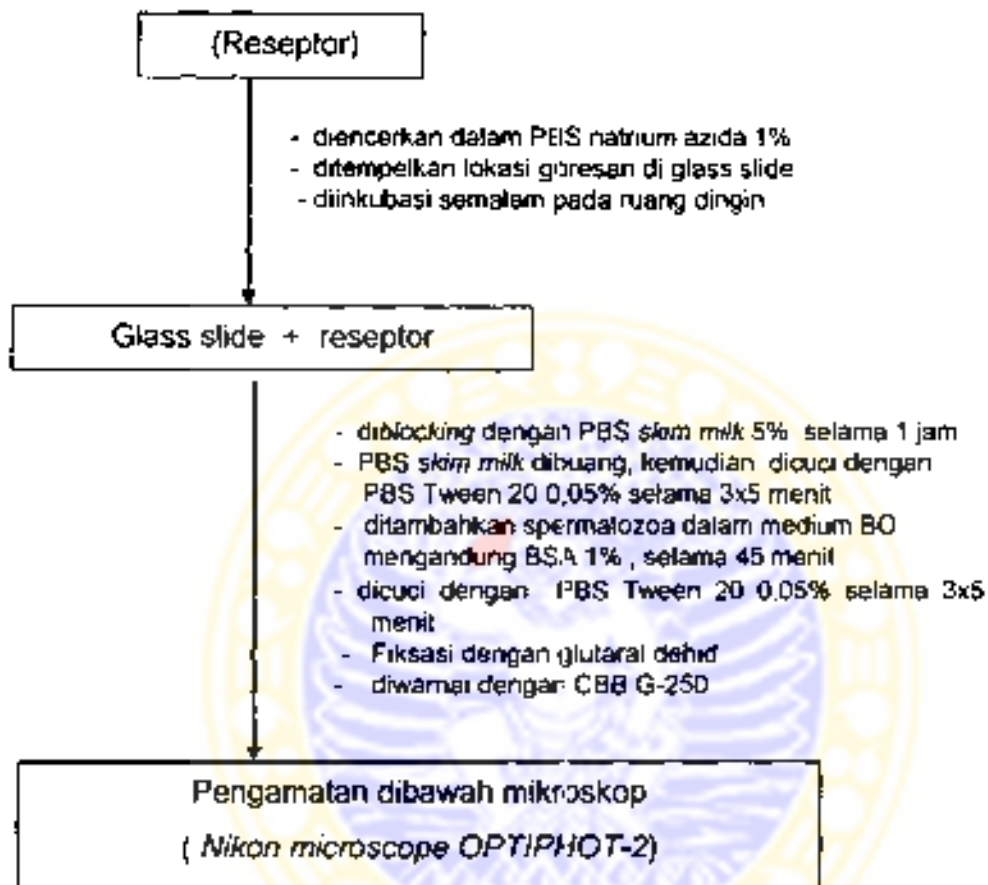
Antibodi primer : anti-bZP3 atau anti-bZP3dG

Lanjutan lampiran 2

L.2.10. Uji Western Blot Terhadap bZP3 Dengan Anti-bZP3 Dan bZP3dG Dengan Anti-bZP3dG



L.2.11. Uji Pengikatan Reseptor Spermatozoa Dengan Atau Tanpa Kehadiran Anti-bZP3 Maupun Anti-bZP3dG



Keterangan : Pada perlakuan ada yang mengalami penambahan anti-bZP3 dan anti- bZP3dG ditempelkan bersama reseptor

Lampiran 3. Pengukuran Kandungan Glikoprotein dan Karbohidrat bZP dan bZP3

L.3.1. Protein Standar

Tabel L.3.1 Komposisi Protein Standar Absorbansi pada 550 nm

Protein	Konsentrasi protein (mg/mL)	Karbohidrat Total (%)	Absorbansi pada 550 nm
Blanko	0	0	0,111
Lysozyme	2,5	0	0,217
Bovine S.A	2,5	sedikit	0,280
Ovalbumin	2,5	3,2	0,414
Apo- Transferin	0,25	5,8	0,747
Fetuin	0,25	22,9	0,520
	2,5	22,9	5,26 /perhitungan
α_1 - acid glikoprotein	0,25	41,4	0,6
	2,5	41,4	6,1/perhitungan

L.3.2 Perhitungan Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat bZP

$$\text{Glikoprotein(mg/mL)} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \times C$$

protein(mg/mL) \times pengenceran

Karbohidrat(mg/mL) = Kandungan glikoprotein \times % total karbohidrat standar

Keterangan :

absorbansi standar = 0,603

Konsentrasi protein standar = 0,25 mg/mL

% total karbohidrat standar = 41,4%

Pengenceran = 24 x

Lanjutan lampiran 3

$$\begin{aligned} \text{Glikoprotein (mg/mL)} &= \frac{0,673}{0,603} \cdot 0,25 \text{ mg/mL} \cdot \frac{400}{16,7} \\ &= 6,683 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Karbohidrat (mg/mL)} &= 6,683 \text{ mg/mL} \cdot 41,4\% \\ &= 2,767 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan glikoprotein 170 bZP dalam 0,19 ml} \\ &= 6683 \text{ } \mu\text{g/mL} \cdot 0,19 \text{ mL} \\ &= 1269,77 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan glikoprotein setiap bZP} &= \frac{1269,77}{170} \\ &= 7,47 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan karbohidrat dalam 170 bZP dalam 0,19 ml} \\ &= 2767 \text{ } \mu\text{g/mL} \cdot 0,19 \text{ mL} \\ &= 525,73 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan karbohidrat dalam setiap bZP} &= \frac{525,73}{170} \\ &= 3,09 \text{ } \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{\sum X}{n}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan glikoprotein per ZP} &= \frac{7,47 + 7,46 + 7,46 + 7,49}{4} \\ &= 7,47 \text{ } \mu\text{g /ZP} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan karbohidrat per ZP} &= \frac{3,09 + 3,10 + 3,09 + 3,08}{4} \\ &= 3,09 \text{ } \mu\text{g /ZP/osit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan protein per ZP} &= 7,47 - 3,09 \text{ } \mu\text{g /ZP} \\ &= 4,38 \text{ } \mu\text{g /ZP/osit} \end{aligned}$$

$$\text{Simpangan baku} = \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - \frac{(\sum X)^2}{n^2}}$$

$$\begin{aligned} \text{Simpangan baku kandungan glikoprotein per Zp} \\ &= \sqrt{\frac{223,2012}{4} - \frac{(29,88)^2}{16}} \\ &= 0,06 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Simpangan baku kandungan karbonidrat per ZP} &= \sqrt{\frac{38,1926}{4} - \frac{(12,36)^2}{16}} \\ &= 0,04 \end{aligned}$$

L.3.3 Perhitungan Kandungan Glikoprotein Dan Karbohidrat bZP3

$$\text{Glikoprotein (mg/mL)} = \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi standar}} \cdot C$$

protein (mg/mL) · pengenceran

$$\text{Karbohidrat (mg/mL)} = \text{Kandungan glikoprotein} \times \% \text{ total karbohidrat standar}$$

Keterangan

absorbansi standar = 0.603

Konsentrasi protein standar = 0.25 mg/mL

% total karbohidrat standar = 41,4%

Pengenceran = 24 x

$$\begin{aligned} \text{Glikoprotein (mg/mL)} &= \frac{0,735}{0,603} \cdot 0,25 \text{ mg/mL} \times \frac{400}{16,7} \\ &= 7.300 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Karbohidrat (mg/mL)} &= 7.300 \text{ mg/mL} \times 41,4\% \\ &= 3.022 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan glikoprotein dalam 2000 bZP3} &= 7300 \mu\text{g/mL} \times 0,6 \text{ mL} \\ &= 4380 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan glikoprotein set- ap bZP3} &= \frac{4380}{2000} \\ &= 2,19 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan karbohidrat dalam 2000 bZP3 dalam 0,6 ml} &= 3022 \mu\text{g/mL} \times 0,6 \text{ mL} \\ &= 1813,2 \mu\text{g} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kandungan karbohidrat per bZP3} &= \frac{1813,2}{2000} \\ &= 0,91 \mu\text{g} \end{aligned}$$

Lanjutan lampiran 3

$$\text{Rata-rata} = \frac{\sum X}{n}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan glikoprotein per ZP} &= \frac{2,19 + 2,18 + 2,20 + 2,19}{4} \\ &= 2,19 \mu\text{g /ZP} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan karbohidrat per ZP} &= \frac{0,91 + 0,90 + 0,92 + 0,91}{4} \\ &= 0,91 \mu\text{g /ZP/foosit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata kandungan protein per ZP} &= 2,19 - 0,91 \mu\text{g /ZP} \\ &= 1,28 \mu\text{g /ZP/foosit} \end{aligned}$$

$$\text{Simpangan baku} = \sqrt{\frac{\sum X^2}{n} - \frac{(\sum X)^2}{n^2}}$$

$$\begin{aligned} \text{Simpangan baku kandungan glikoprotein per ZP} &= \sqrt{\frac{119,1846}{3} - \frac{(8,76)^2}{4}} \\ &= 0,04 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Simpangan baku kandungan karbohidrat per ZP} &= \sqrt{\frac{3,3126}{3} - \frac{(3,64)^2}{4}} \\ &= 0,04 \end{aligned}$$

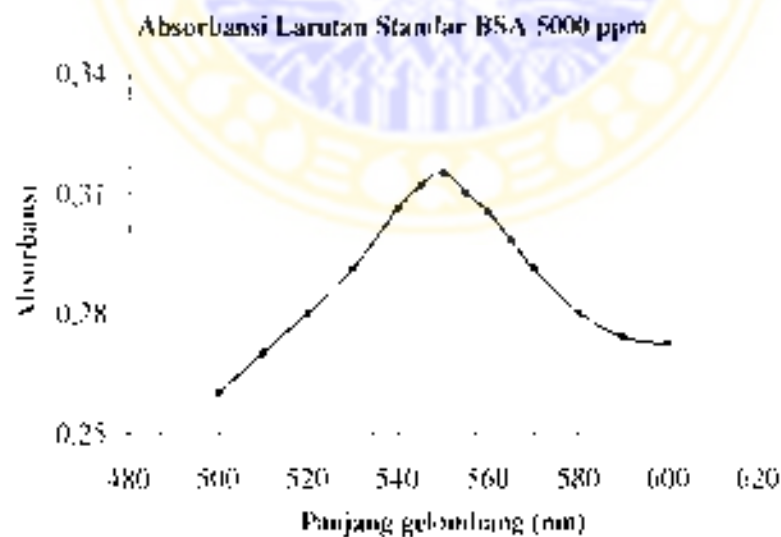
Lampiran 3.4. Pembuatan Kurva Standar BSA dan Pengukuran Kadar Protein bZP

L.3.4.1. Penentuan λ maks. Larutan BSA 5000 ppm

Tabel L.3.4.1. Nilai Absorbansi Larutan Standar BSA 5000 ppm Pada Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Panjang Gelombang	Absorbansi
500	0,260
510	0,270
520	0,280
530	0,291
540	0,306
545	0,312
550*	0,315
555	0,310
560	0,305
565	0,298
570	0,291
580	0,280
590	0,273
600	0,272

* Panjang Gelombang Maksimum



Gambar L.3.4.1 Kurva Panjang Gelombang maksimum: Larutan BSA 5000 ppm

Lanjutan lampiran 3

L3.4.2 Pembuatan Kurva Standar BSA

Tabel L.3.4.2.1. Absorbansi Larutan Standar BSA

Konsentrasi X (ppm)	Absorbansi			Absorbansi Rata - rata
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	
1000	0,052	0,054	0,060	0,055
2000	0,093	0,098	0,111	0,101
3000	0,146	0,145	0,152	0,147
4000	0,208	0,217	0,210	0,216
5000	0,311	0,284	0,309	0,301
6000	0,325	0,326	0,333	0,328
7000	0,389	0,393	0,398	0,393
8000	0,440	0,431	0,428	0,433
9000	0,483	0,482	0,478	0,481

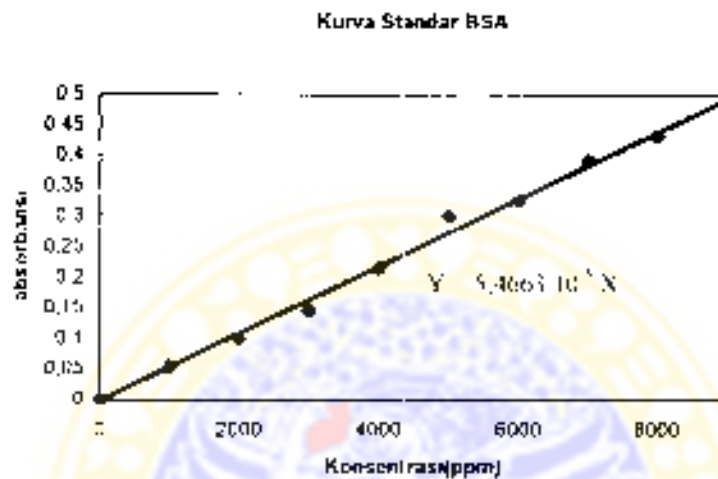
Tabel L 3.4.2.2. Analisa Regresi Linier Kurva Standar BSA

X (ppm)	Y Rata-rata	X ²	XY	Y ²
1000	0,055	10 ⁶	55	0,0030
2000	0,101	4.10 ⁶	202	0,0102
3000	0,147	9.10 ⁶	441	0,0217
4000	0,216	16.10 ⁶	864	0,0500
5000	0,301	25.10 ⁶	1505	0,0906
6000	0,328	36.10 ⁶	1968	0,1076
7000	0,393	49.10 ⁶	2751	0,1544
8000	0,433	64.10 ⁶	3464	0,1875
9000	0,481	81.10 ⁶	4329	0,2313
Jumlah		285.10 ⁶	15579	0,8563

$$a = \frac{\sum XY}{\sum X^2} = \frac{15579}{285 \cdot 10^6} = 5,4663 \cdot 10^{-5}$$



$$r = \frac{\sum XY}{\sqrt{\sum X^2 \sum Y^2}} = \frac{15579}{\sqrt{15621,9}} = 0,9973$$



Gambar L.3.4.2. Kurva Standar BSA

L.3.5 . Perhitungan Kandungan Protein bZP

Kandungan protein bZP dihitung dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA ($Y = 5,4663 \cdot 10^{-5} X$). Contoh perhitungan untuk nilai absorbansi protein adalah sebagai berikut :

Absorbansi = 0,309

$$Y = 5,4663 \cdot 10^{-5} X$$

$$X = \frac{Y}{5,4663 \cdot 10^{-5}} = \frac{0,309}{5,4663 \cdot 10^{-5}}$$

Lanjutan lampiran 3

= 5652,82 ppm, di mana X adalah konsentrasi protein total

Konsentrasi protein bZP :

= konsentrasi protein total – konsentrasi protein standar yang ditambahkan.

$$= 5652,82 - 5000$$

$$= 652,820 \text{ ppm}$$

$$= 652,82 \mu\text{g/mL} \times \frac{1}{0,5} \text{ mL} = 1305,64 \mu\text{g/mL}$$

$$150 \text{ ZP dalam } 0,5 \text{ mL} = 0,5 \text{ mL} \times 1305,00 \mu\text{g/mL}$$

$$= 652,82 \mu\text{g}$$

$$\text{Per ZP/oosit} = \frac{652,82 \mu\text{g}}{150 \text{ ZP}} = 4,35 \mu\text{g/ZP/oosit}$$

Dengan cara yang sama maka akan diperoleh data seperti pada

Tabel L.3.5.1.

Tabel L.3.5.1. Kandungan Protein Sampel bZP

Jumlah ZP (oosit)	Absorbansi	Kand. Protein per bZP ($\mu\text{g/ZP}$)
150	0,309	4,35
150	0,309	4,35
150	0,310	4,47
150	0,310	4,35
Rerata		4,33 ± 0,15

$$\text{Simpangan baku} = \sqrt{\frac{\sum X^2 - (\sum X)^2}{n}}$$

Simpangan baku kandungan protein per osil

$$= \sqrt{\frac{176,7484 - (17,52)^2 : 4}{3}}$$

$$= 0.15$$

1.3.6 . Perhitungan Kandungan Protein bZP3

Kandungan protein ZP dihitung dengan cara mengkonversi data absorbansi ke konsentrasi melalui persamaan regresi linier kurva standar BSA ($Y = 5,4663 \cdot 10^{-5} X$). Contoh perhitungan untuk nilai absorbansi protein adalah sebagai berikut :

$$\text{Absorbansi} = 0,326$$

$$Y = 5,4663 \cdot 10^{-5} X$$

$$X = \frac{Y}{5,4663 \cdot 10^{-5}} = \frac{0,326}{5,4663 \cdot 10^{-5}}$$

$$= 5967,50 \text{ ppm, di mana } X \text{ adalah konsentrasi protein total}$$

Konsentrasi protein bZP3 :

$$= \text{konsentrasi prot. total} - \text{konsentrasi protein standar yang ditambahkan}$$

$$= 5967,50 - 5000$$

$$= 967,50 \text{ ppm}$$

$$= 967,50 \text{ } \mu\text{g/mL} \times \frac{1}{0.5} \text{ mL} = 1935 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

900 ZP dalam 0,6 mL protein Hasil ektroelusi :

$$= 0.6 \text{ mL} \times 1935 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 4. Pembuatan Kurva Standar Masa Molekul Relatif Protein Standar Dan Penentuan Masa Molekul Relatif (Mr.) Sampel Glikoprotein bZP3 Dan Protein bZP3dG

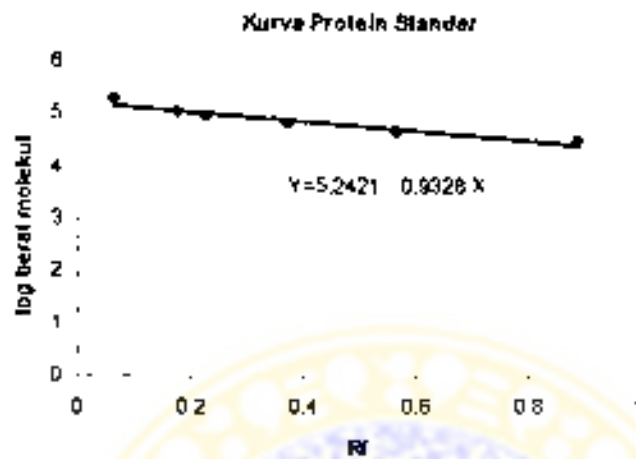
L.4.1 Pembuatan Kurva Berat Molekul Protein Standar

Penentuan berat molekul dilakukan dengan bantuan protein standar. Untuk menentukan berat molekul glikoprotein dilakukan dengan menghitung Rf (Retardation Factor) dari masing – masing pita, menggunakan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal}}$$

Tabel L.4 .1 Nilai Rf Dan Berat Molekul Protein Standar

Rf (X)	Berat Molekul (Dalton)	Log berat molekul (Y)
0,064	200.000	5,3010
0,177	116.250	5,0654
0,223	97.400	4,9885
0,371	66.200	4,8208
0,564	45.000	4,6532
0,887	31.000	4,4912



Gambar L.4.1. Kurva Berat Molekul Protein Standar

Dari persamaan regresi linier $Y = a + bX$

$$a = 5.2421$$

$$b = -0.9328$$

Maka $Y = 5.2421 - 0.9328X$

$$R = 0.96$$

L.4.2. Perhitungan Berat Molekul Sampel bZP3 (SDS-PAGE Satu Dimensi)

Perhitungan berat molekul sampel dengan mengukur harga Rf dari masing – masing sampel dengan mengkonversikan dalam persamaan regresi linier. Berikut adalah contoh perhitungan berat molekul sampel :
misalnya nilai Rf = 0,379

Lanjutan lampiran 4

maka dikonversikan dalam persamaan $Y = 5,2421 - 0,9328X$

$$Y = 5,2421 - 0,9328(0,379)$$

$$= 4,889$$

maka berat molekul anti log 4,868 = 77,446 kDa

Nilai BM sampel dapat dilihat pada Tabel L.4.2 sebagai berikut :

Tabel L.4.2 Nilai Berat Molekul Dari Pita-Pita Sampel bZP

Jumlah ZP	Rf	Log BM	BM (Dalton)	Jenis ZP
1000	0,172	5,080	120.255	bZP1-2
	0,264	4,996	99.083	
	0,348	4,917	82.603	bZP3
	0,380	4,888	77.268	
	0,548	4,731	53.826	bZP4
1000	0,172	5,080	120.255	bZP1-2
	0,264	4,996	99.777	
	0,348	4,917	82.603	bZP3
	0,379	4,889	77.446	
	0,548	4,731	53.826	bZP4
1000	0,172	5,080	120.255	bZP1-2
	0,264	4,996	99.777	
	0,348	4,917	82.603	bZP3
	0,379	4,889	77.446	
	0,548	4,731	53.826	bZP4

Rataan bZP1-bZP2 : 109,985 ± 1,128 kDa

bZP3 : 79,995 ± 0,051 kDa

bZP4 : 53,826 ± 0,000kDa

L.4.3. Perhitungan Berat Molekul Sampel bZP3dG (SDS-PAGE Satu Dimensi)

Perhitungan berat molekul sampel dengan mengukur harga R_f dari masing – masing sampel dengan mengkonversikan dalam persamaan regresi linier. Berikut adalah contoh perhitungan berat molekul sampel misalnya nilai $R_f = 0,578$

maka dikonversikan dalam persamaan $Y = 5,2421 - 0,9328X$

$$Y = 5,2421 - 0,9328 (0,578)$$

$$= 4,7029$$

maka berat molekul anti $\log 4,7029 = 50.459$ Dalton = 50,459 kDa

Nilai BM sampel dapat dilihat pada Tabel L.4.3 sebagai berikut :

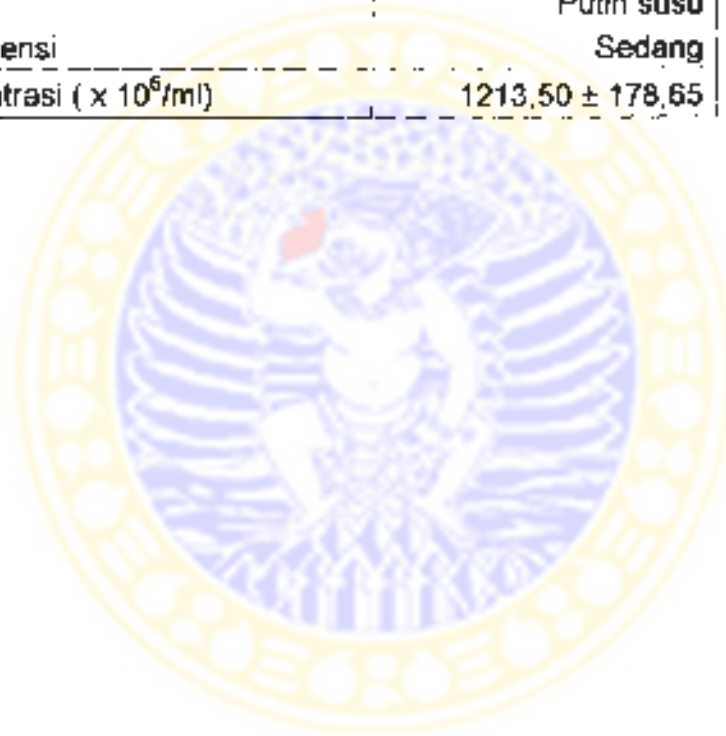
Tabel L.4.3. Nilai Berat Molekul Relatif (BM) Dan Pita bZP3dG

R_f	Log BM	BM (Dalton)	Rataan BM \pm SD (kDa)
0,577	4,7039	50,468	
0,578	4,7029	50,459	50,462 \pm 0,004
0,578	4,7029	50,459	

Lampiran 5. Hasil Pemeriksaan Kualitas Semen Sapi

Tabel L. 5. 1. Hasil Pemeriksaan Semen Sapi

Parameter	Data
Volume (ml)	1 ± 0
Motilitas individu (%)	70 ± 0
Motilitas massa	2+
pH	6,96 ± 0,11
Viabilitas (%)	77,08 ± 4,50
Warna	Putih susu
Konsistensi	Sedang
Konsentrasi (x 10 ⁶ /ml)	1213,50 ± 178,65



Lampiran 6. Data Embrio Kelinci Pasca Imunisasi Dengan *bZP3* Dan *bZP3dG*

Kelompok	Hari Ke-	Ulangan								Total	Rerata
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Kontrol	60	7	4	3	2	4	3	5	4	32	4,000
	90	6	5	4	3	3	4	2	3	30	3,750
	120	4	6	3	5	2	3	3	4	30	3,750
	150	5	6	6	4	3	3	4	2	33	4,125
	180	5	6	4	2	3	4	3	4	31	3,875
	210	4	6	4	2	3	5	3	4	31	3,875
<i>bZP3</i>	60	0	0		0	0	0	0	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0,250
	210	3	2	4	3	2	3	3	4	24	3,000
<i>bZP3dG</i>	60	0	0		0	0	0	0	0	0	0
	90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	180	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1,125
	210	2	3	3	1	2	0	2	2	15	1,875

Lampiran 7 Sekuen Asam Amino *bovine* Zona Pellucida- 3 (NCBI 2002)

1 mgpcsrifvc fllwgstela spqpfwddet erfrpskppa vmv
 61
 121
 181
 241
 301 rwsp vegptdicrc cskgrecgig rsmrlshreg rpvprsrhhv teeadvtygp
 361 liflrkmndr gvegptsspp lvmiglglat vmtitlaaiv lgllgrlraa shpvcpsas
 421 q

Lampiran 8. Data ELISA Titer antibodi (IgG) Pada Tikus (*Rattus norvegicus*)

Han	KLP	Ulangan							
		1	2	3	4	5	6	7	8
	Pi	0.003	0.003	0.002	0.002	0.003	0.003	0.004	0.003
3	Kontrol	0.01	0.012	0.011	0.01	0.011	0.011	0.01	0.011
	bZP3	0.049	0.049	0.051	0.052	0.051	0.05	0.052	0.052
	bZP3dG	0.064	0.059	0.06	0.063	0.062	0.06	0.062	0.061
45	Kontrol	0.009	0.01	0.012	0.01	0.01	0.012	0.009	0.011
	bZP3	0.063	0.061	0.062	0.062	0.059	0.062	0.062	0.062
	bZP3dG	0.074	0.073	0.072	0.073	0.073	0.074	0.074	0.073
52	Kontrol	0.01	0.01	0.011	0.012	0.01	0.011	0.012	0.009
	bZP3	0.086	0.086	0.085	0.087	0.085	0.087	0.086	0.009
	bZP3dG	0.093	0.093	0.094	0.092	0.093	0.094	0.091	0.085
59	Kontrol	0.011	0.012	0.01	0.012	0.011	0.012	0.011	0.012
	bZP3	0.104	0.103	0.102	0.102	0.103	0.104	0.102	0.102
	bZP3dG	0.12	0.118	0.119	0.118	0.117	0.117	0.119	0.119
66	Kontrol	0.01	0.012	0.011	0.012	0.011	0.01	0.012	0.011
	bZP3	0.123	0.124	0.12	0.124	0.123	0.122	0.121	0.12
	bZP3dG	0.138	0.138	0.139	0.138	0.14	0.138	0.137	0.141
73	Kontrol	0.012	0.01	0.011	0.012	0.013	0.012	0.011	0.012
	bZP3	0.11	0.118	0.118	0.108	0.108	0.11	0.112	0.109
	bZP3dG	0.13	0.13	0.131	0.129	0.131	0.128	0.132	0.13
80	Kontrol	0.011	0.012	0.011	0.012	0.011	0.012	0.01	0.011
	bZP3	0.072	0.078	0.076	0.076	0.076	0.076	0.078	0.078
	bZP3dG	0.084	0.084	0.085	0.082	0.082	0.08	0.08	0.081
87	Kontrol	0.01	0.012	0.01	0.011	0.012	0.012	0.012	0.011
	bZP3	0.044	0.042	0.043	0.043	0.045	0.044	0.043	0.042
	bZP3dG	0.055	0.054	0.054	0.055	0.055	0.055	0.058	0.055
105	Kontrol	0.011	0.012	0.011	0.01	0.011	0.012	0.012	0.011
	bZP3	0.085	0.083	0.085	0.085	0.085	0.087	0.084	0.085
	bZP3dG	0.097	0.098	0.097	0.097	0.097	0.097	0.096	0.098
112	Kontrol	0.012	0.012	0.01	0.01	0.014	0.012	0.012	0.014
	bZP3	0.11	0.108	0.108	0.108	0.111	0.109	0.109	0.115
	bZP3dG	0.14	0.138	0.138	0.139	0.141	0.14	0.138	0.141
119	Kontrol	0.009	0.01	0.01	0.013	0.012	0.012	0.011	0.01
	bZP3	0.182	0.184	0.182	0.184	0.179	0.181	0.183	0.185
	bZP3dG	0.243	0.244	0.246	0.246	0.24	0.24	0.241	0.246
126	Kontrol	0.012	0.009	0.013	0.012	0.011	0.012	0.012	0.011
	bZP3	0.223	0.223	0.224	0.224	0.222	0.221	0.224	0.228
	bZP3dG	0.289	0.287	0.288	0.287	0.286	0.289	0.289	0.288
133	Kontrol	0.012	0.01	0.01	0.012	0.01	0.011	0.01	0.01
	bZP3	0.179	0.178	0.176	0.174	0.176	0.178	0.174	0.179
	bZP3dG	0.189	0.2	0.197	0.187	0.198	0.198	0.197	0.199
140	Kontrol	0.01	0.013	0.011	0.01	0.009	0.012	0.012	0.011
	bZP3	0.082	0.082	0.082	0.085	0.085	0.084	0.084	0.082
	bZP3dG	0.094	0.095	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.097
147	Kontrol	0.01	0.012	0.012	0.01	0.009	0.011	0.009	0.011
	bZP3	0.041	0.041	0.039	0.041	0.039	0.037	0.039	0.038
	bZP3dG	0.051	0.051	0.051	0.047	0.049	0.048	0.047	0.046

Lampiran 9. Hasil Analisis Interaksi 3 jenis imunogen (Freund's Adjuvant, bZP3 bZP3 dalam Freund's Adjuvant dan bZP3dG dalam Freund's Adjuvant) Dengan 15 Variasi Lama imunisasi Pada Kelompok Tikus (*Rattus novergicus*)

Error Mean Square = 1,900e-005
 Error Degrees of Freedom = 315
 No. of observations to calculate a mean = 8

Least Significant Difference Test
 LSD value = 0.003595 at alpha = 0.10

Original Order	Mean	Ranked Order	Mean	Significance
1	0.01075	34	0.2876	A
2	0.05075	33	0.2492	B
3	0.06137	55	0.2236	C
4	0.01037	39	0.1981	D
5	0.04142	32	0.1825	E
6	0.07325	38	0.1767	F
7	0.01062	30	0.1394	G
8	0.07437	15	0.1386	H
9	0.00107	18	0.1303	I
10	0.03137	14	0.1221	J
11	0.1027	12	0.1184	K
12	0.1184	17	0.1116	L
13	0.01112	19	0.1097	M
14	0.1221	11	0.1027	N
15	0.1386	27	0.09712	O
16	0.01162	42	0.09450	P
17	0.1116	9	0.09187	Q
18	0.1301	26	0.08481	R
19	0.01125	41	0.08323	S
20	0.07625	21	0.08225	T
21	0.08225	8	0.07637	U
22	0.01125	20	0.07625	V
23	0.04325	6	0.07325	W
24	0.05487	5	0.06162	X
25	0.01125	4	0.06137	Y
26	0.00487	24	0.05487	Z
27	0.09712	2	0.05075	aa
28	0.01200	45	0.04850	ab
29	0.1097	23	0.04325	ac
30	0.1394	44	0.03937	ad
31	0.01087	28	0.01200	ae
32	0.1825	16	0.01162	af
33	0.2492	34	0.01150	ag
34	0.01150	10	0.01137	ah
35	0.2236	25	0.01125	ai
36	0.2876	22	0.01125	aj
37	0.01082	19	0.01125	ak
38	0.1767	13	0.01112	al
39	0.1981	40	0.01100	am
40	0.01100	31	0.01087	an
41	0.04325	1	0.01075	ao
42	0.09450	37	0.01062	ap
43	0.01050	7	0.01067	aq
44	0.03937	43	0.01050	ar
45	0.04850	4	0.01037	as

Lampiran 10. Data ELISA Titer antibodi (IgG) Pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Hama ke-	KLP	Ulangan								Total	Rataan
		1	2	3	4	5	6	7	8		
0	Premium	0.003	0.002	0.002	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.024	0.003
36	Kontrol	0.011	0.012	0.011	0.012	0.014	0.012	0.012	0.011	0.095	0.0108
	bZP3	0.048	0.043	0.045	0.043	0.043	0.045	0.044	0.048	0.357	0.04483
	bZP3dG	0.054	0.048	0.051	0.049	0.05	0.049	0.053	0.052	0.406	0.05075
43	Kontrol	0.012	0.011	0.012	0.011	0.014	0.012	0.012	0.013	0.097	0.01213
	bZP3	0.051	0.051	0.05	0.052	0.051	0.05	0.053	0.05	0.408	0.051
	bZP3dG	0.055	0.058	0.058	0.058	0.056	0.058	0.059	0.056	0.454	0.05675
52	Kontrol	0.012	0.012	0.012	0.012	0.014	0.012	0.011	0.012	0.097	0.01243
	bZP3	0.056	0.055	0.055	0.057	0.058	0.056	0.057	0.056	0.449	0.05613
	bZP3dG	0.059	0.058	0.06	0.06	0.059	0.061	0.062	0.062	0.481	0.06013
59	Kontrol	0.013	0.012	0.013	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012	0.101	0.01283
	bZP3	0.077	0.078	0.072	0.073	0.076	0.078	0.072	0.073	0.597	0.07463
	bZP3dG	0.088	0.089	0.093	0.094	0.087	0.087	0.084	0.085	0.687	0.08588
66	Kontrol	0.013	0.012	0.013	0.012	0.011	0.012	0.012	0.012	0.097	0.01213
	bZP3	0.087	0.088	0.082	0.088	0.089	0.089	0.088	0.086	0.697	0.08713
	bZP3dG	0.088	0.089	0.093	0.099	0.1	0.1	0.099	0.097	0.785	0.09813
73	Kontrol	0.013	0.013	0.012	0.012	0.012	0.01	0.01	0.012	0.094	0.01175
	bZP3	0.12	0.135	0.138	0.12	0.135	0.115	0.13	0.12	1.011	0.12638
	bZP3dG	0.14	0.155	0.152	0.167	0.134	0.124	0.135	0.147	1.154	0.14425
80	Kontrol	0.012	0.02	0.012	0.012	0.012	0.011	0.013	0.012	0.104	0.013
	bZP3	0.089	0.077	0.07	0.07	0.082	0.075	0.086	0.085	0.634	0.07925
	bZP3dG	0.093	0.084	0.088	0.082	0.092	0.084	0.096	0.09	0.719	0.08988
87	Kontrol	0.011	0.012	0.012	0.012	0.012	0.015	0.012	0.013	0.097	0.01213
	bZP3	0.045	0.048	0.047	0.048	0.045	0.048	0.049	0.047	0.378	0.04725
	bZP3dG	0.055	0.054	0.054	0.055	0.055	0.058	0.058	0.055	0.44	0.055
105	Kontrol	0.012	0.012	0.011	0.013	0.011	0.011	0.012	0.012	0.094	0.01175
	bZP3	0.135	0.136	0.132	0.13	0.145	0.13	0.128	0.135	1.071	0.13388
	bZP3dG	0.143	0.143	0.142	0.14	0.152	0.142	0.138	0.14	1.14	0.1425
112	Kontrol	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012	0.011	0.011	0.013	0.096	0.012
	bZP3	0.151	0.149	0.149	0.147	0.146	0.146	0.142	0.145	1.175	0.14688
	bZP3dG	0.161	0.159	0.159	0.158	0.158	0.158	0.154	0.155	1.28	0.1575
119	Kontrol	0.011	0.012	0.012	0.012	0.013	0.012	0.012	0.013	0.097	0.01213
	bZP3	0.232	0.223	0.235	0.23	0.232	0.242	0.225	0.223	1.842	0.23025
	bZP3dG	0.252	0.253	0.256	0.253	0.252	0.262	0.252	0.253	2.032	0.254
126	Kontrol	0.011	0.012	0.012	0.013	0.012	0.011	0.012	0.011	0.094	0.01175
	bZP3	0.299	0.292	0.285	0.307	0.289	0.285	0.279	0.307	2.343	0.29288
	bZP3dG	0.349	0.342	0.338	0.342	0.339	0.335	0.33	0.337	2.712	0.339
133	Kontrol	0.012	0.012	0.011	0.012	0.011	0.012	0.012	0.01	0.092	0.0115
	bZP3	0.112	0.105	0.098	0.12	0.097	0.096	0.095	0.126	0.847	0.10588
	bZP3dG	0.139	0.129	0.119	0.13	0.126	0.122	0.123	0.138	1.026	0.12825
140	Kontrol	0.012	0.012	0.012	0.011	0.011	0.01	0.011	0.01	0.089	0.01113
	bZP3	0.071	0.069	0.069	0.084	0.07	0.068	0.066	0.072	0.549	0.06863
	bZP3dG	0.082	0.08	0.081	0.082	0.08	0.083	0.079	0.082	0.649	0.08113
147	Kontrol	0.01	0.011	0.011	0.01	0.011	0.01	0.01	0.01	0.083	0.01038
	bZP3	0.058	0.058	0.06	0.058	0.057	0.058	0.059	0.058	0.484	0.058
	bZP3dG	0.072	0.073	0.071	0.073	0.073	0.071	0.074	0.072	0.579	0.07234
154	Kontrol	0.01	0.011	0.011	0.01	0.011	0.01	0.01	0.01	0.083	0.01038
	bZP3	0.045	0.039	0.041	0.043	0.039	0.038	0.038	0.048	0.329	0.04113
	bZP3dG	0.052	0.049	0.047	0.05	0.048	0.051	0.05	0.051	0.398	0.04975

Lampiran 11. Hasil Analisis Interaksi 3 jenis imunogen (*Freund's Adjuvant*, *bZP3* dalam *Freund's Adjuvant* dan *bZP3dG* dalam *Freund's Adjuvant*) Dengan 16 Variasi Lama Imunisasi Pada Kelompok Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) Lokal.

Error Mean Square = 1.800e-05
 Error Degrees of Freedom = 336
 No. of observations to calculate a mean = 8

Least Significant Difference Test
 LSD value = 0.003499 at alpha = 0.10

Original Order		Ranked Order	
Mean 1 = 0.01187	W	Mean 35 = 0.2390	A
Mean 2 = 0.04462	U	Mean 35 = 0.2929	B
Mean 3 = 0.05075	S	Mean 33 = 0.2540	C
Mean 4 = 0.01200	W	Mean 32 = 0.2303	D
Mean 5 = 0.05007	S	Mean 30 = 0.1575	E
Mean 6 = 0.05675	QR	Mean 29 = 0.1469	F
Mean 7 = 0.01212	W	Mean 18 = 0.1442	FG
Mean 8 = 0.05612	R	Mean 27 = 0.1425	G
Mean 9 = 0.06012	Q	Mean 26 = 0.1339	R
Mean 10 = 0.01262	W	Mean 39 = 0.1292	I
Mean 11 = 0.07463	O	Mean 17 = 0.1264	J
Mean 12 = 0.08587	K	Mean 38 = 0.1059	K
Mean 13 = 0.01212	W	Mean 15 = 0.09812	L
Mean 14 = 0.08712	LM	Mean 21 = 0.08987	LM
Mean 15 = 0.09812	X	Mean 14 = 0.08712	LM
Mean 16 = 0.01162	W	Mean 12 = 0.08587	M
Mean 17 = 0.1264	I	Mean 42 = 0.08112	N
Mean 18 = 0.1442	FG	Mean 20 = 0.07925	N
Mean 19 = 0.01300	W	Mean 11 = 0.07463	O
Mean 20 = 0.07925	N	Mean 45 = 0.07237	O
Mean 21 = 0.08987	L	Mean 41 = 0.06862	P
Mean 22 = 0.01212	W	Mean 9 = 0.06012	Q
Mean 23 = 0.04725	TU	Mean 44 = 0.05800	QR
Mean 24 = 0.05500	R	Mean 6 = 0.05675	QR
Mean 25 = 0.01175	W	Mean 8 = 0.05612	R
Mean 26 = 0.1339	B	Mean 24 = 0.05500	R
Mean 27 = 0.1425	G	Mean 5 = 0.05087	S
Mean 28 = 0.01200	W	Mean 3 = 0.05075	S
Mean 29 = 0.1469	Z	Mean 40 = 0.04975	ST
Mean 30 = 0.1575	Z	Mean 23 = 0.04725	TU
Mean 31 = 0.01212	W	Mean 7 = 0.04462	U
Mean 32 = 0.2303	D	Mean 47 = 0.04112	V
Mean 33 = 0.2540	C	Mean 19 = 0.01300	W
Mean 34 = 0.01175	W	Mean 10 = 0.01262	W
Mean 35 = 0.2929	B	Mean 13 = 0.01212	W
Mean 36 = 0.3390	A	Mean 22 = 0.01212	W
Mean 37 = 0.01150	W	Mean 7 = 0.01212	W
Mean 38 = 0.1059	J	Mean 31 = 0.01212	W
Mean 39 = 0.1282	I	Mean 4 = 0.01200	X
Mean 40 = 0.01112	W	Mean 28 = 0.01200	W
Mean 41 = 0.06862	P	Mean 1 = 0.01187	W
Mean 42 = 0.08112	N	Mean 34 = 0.01175	W
Mean 43 = 0.01037	W	Mean 25 = 0.01175	W
Mean 44 = 0.05800	QR	Mean 16 = 0.01162	W
Mean 45 = 0.07237	O	Mean 37 = 0.01150	W
Mean 46 = 0.01037	W	Mean 40 = 0.01112	W
Mean 47 = 0.04112	V	Mean 43 = 0.01037	W
Mean 48 = 0.04975	ST	Mean 46 = 0.01037	W



Lampiran 12. Pengamatan Jumlah Folikel Jaringan Ovarium Kelinci Pasca Imunisasi Dengan Beberapa Kulit Protein ZP sapi.

Tabel L. 12.1 Rataan Jumlah Folikel Pada Jaringan Ovarium Kelinci Pasca Imunisasi Protein bZP (Mahnani, 2002)

Perlakuan	Jumlah folikel							
	Fpm	Fpr	Fs	Ft	Fa	Cr	Cl	Ca
O1	117	4	9	3	1	2	2	0
O2	112	6	5	3	1	0	2	0
O3	111	6	4	4	2	0	1	1
O4	111	5	7	4	3	0	1	0
Z1	136	14	12	2	2	0	3	0
Z2	124	12	10	5	3	1	2	1
Z3	113	11	8	2	1	0	2	0
Z4	116	12	10	4	1	1	1	0
ZP3	158	23	24	4	4	0	2	0
K	196	30	29	4	3	1	2	0

Keterangan :

O 1	: Crude oosit, 50 buah	K	: Kontrol (Freund's Adjuvant)
O 2	: Crude oosit, 100 buah	Fpm	: Folikel primordial
O 3	: Crude oosit, 150 buah	Fp	: Folikel primer
O 4	: Crude oosit, 200 buah	Fs	: Folikel sekunder
Z 1	: Crude ZP, 50 buah	Ft	: Folikel tersier
Z 2	: Crude ZP, 100 buah	Fa	: Folikel atresia
Z 3	: Crude ZP, 150 buah	Cr	: Korpus rubrum
Z 4	: Crude ZP, 200 buah	Cl	: Korpus luteum
ZP 3	: bZP3	Ca	: Korpus atresi