

DISERTASI

IDENTIFIKASI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI RESEPTOR FERTILISASI (ZONA PELUSIDA-3) KAMBING SEBAGAI KANDIDAT BAHAN IMUNOKONTRASEPSI

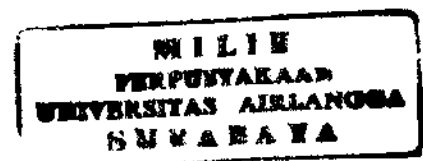
Penelitian Eksploratif Laboratorik dan Fertilisasi *in-vitro*
Pada Hewan Model



Dis. Mustofa
11/2
1

IMAM MUSTOFA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**



IDENTIFIKASI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI RESEPTOR FERTILISASI (ZONA PELUSIDA-3) KAMBING SEBAGAI KANDIDAT BAHAN IMUNOKONTRASEPSI

**Penelitian Eksploratif Laboratorik dan Fertilisasi *in-vitro*
Pada Hewan Model**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

**Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka**

Pada hari : Rabu

Tanggal : 30 Nopember 2005

Pukul 10.⁰⁰ WIB

Oleh :

**IMAM MUSTOFA
NIM : 090013763 D**

LEMBAR PERSETUJUAN

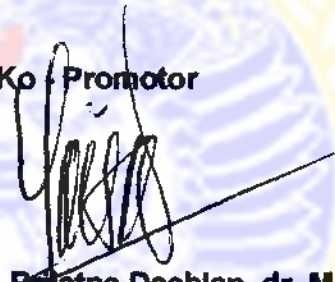
Naskah Disertasi ini Telah Disetujui Tanggal 15 Desember 2005

**Oleh
Promotor**



Prof Dr Laba Mahaputra, drh MSc
NIP. 130 687 550

Ko Promotor



Prof Dr Yoes Priatna Dachlan, dr MSc
NIP. 130 359 278

**Disertasi ini telah diuji pada Ujian Disertasi Tahap I (Tertutup)
Tanggal 11 Oktober 2005**

PANITIA PENGUJI DISERTASI

- Ketua** : 1. Prof Dr H Agus Abadi, dr SpOG.
- Anggota** : 2. Prof Dr Laba Mahaputra, drh MSc.
3. Prof Dr H Yoes Prijatna Dachlan, dr MSc.
4. Prof H Soetjipto, dr MS PhD.
5. Prof Dr Sri Kardjati, dr MSc.
6. Prof Dr H Soehartojo H, drh MSc.
7. Prof Dr J. Alex Pangkahila, dr SpAnd MSc.
8. Dr Fedik Abdul Rantam, drh.



**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 8122/J03/PP/2005
Tanggal : 19 Oktober 2005**

UCAPAN TERIMAKASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala rahmad dan karunia-Nya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Prof Dr Loba Mahaputra drh MSc, sebagai Promotor yang telah memberikan dorongan, bimbingan dan arahan, sebagai pendidik yang senantiasa menanamkan sikap ilmiah dan membangkitkan inspirasi, serta sebagai bapak yang senantiasa mengayomi.

Terimakasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan juga kepada Prof Dr Yoes Prijatna Dachlan dr MSc, sebagai Ko Promotor yang dengan penuh kesabaran dan perhatian telah memberikan motivasi, bimbingan dan saran, sebagai pendidik yang senantiasa membuka lebar cakrawala berpikir, serta sebagai bapak yang senantiasa mencarikan alternatif-alternatif solusi untuk mendapatkan hasil terbaik.

Saya ucapkan terimakasih kepada pemerintah Republik Indonesia, dalam hal ini 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, dan mantan Rektor Universitas Airlangga, Prof Soedarto dr DTMH PhD, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof Dr H Muhammad Amin dr SpP(K), yang telah memberikan fasilitas kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Prof Dr Suhariningsih Ir, dan mantan Ketua Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Prof Dr G N Astika, yang senantiasa memberikan dorongan untuk segera menyelesaikan pendidikan Program Doktor ini.

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang dijabat oleh Prof Dr Ismudiono drh MS, yang telah memberikan ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Doktor, yang selanjutnya senantiasa mendorong saya untuk segera menyelesaikannya.

Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, serta Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional, yang telah mengabulkan beberapa usulan penelitian dalam rangka membangun payung penelitian ini.

Prof Dr H Mas'ud Hariadi drh Mphil, Dr Fedik Abdul Rantam drh, Dr A'ulaniam drh DES, dan rekan-rekan sejawat Kusnoto drh MSi, Suwamo drh MSi, Widjati drh MSi, Dr Pudji Sianto drh M.Kes, atas bantuan wacana, teknis dan dorongannya sampai terselesaikannya disertasi ini.

Para dosen Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, dan para dosen Matakuliah Penunjang Disertasi, yaitu Prof H Soetjipto dr MSc PhD, Aucky Hinting dr PhD, Dr Fedik Abdul Rantam drh, dan Dr Mulya Hadi Santosa.

Tim Penilai Naskah Disertasi ini, yaitu yaitu Prof Dr Sri Kardjati dr MSc, Prof H Soetjipto dr MSc PhD, Dr Fedik Abdul Rantam drh, Prof Dr H Soehartojo Hardjopranjoto, drh MSc, dan Prof Dr H Agus Abadi dr SpOG.

Rekan-rekan sejawat Sri Mulyati drh Mkes dan Tjuk Imam Restiadi drh MSi, yang telah membantu membangun payung penelitian penggunaan zona pelusida kambing sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi dengan menjadi Ketua Peneliti beberapa penelitian, dan merelakan saya tidak banyak membantu dalam pelaksanaan kegiatan akademik di eks Laboratorium Kebidanan Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, serta senantiasa memberikan semangat dan dorongan agar saya segera menyelesaikan Program Doktor ini.

Staf laboratorium : Ida Prastyawati, Mbak Surti, Bapak Puryoto, Helen, Kristanto, dan Bapak Kusen yang telah membantu pelaksanaan teknis di laboratorium dalam penelitian ini.

Pembantu Dekan I, Nunuk Diah Retno Lastuti drh MS, Pembantu Dekan III, Dr Koesnoto Supranianondo drh MS, serta teman-teman sejawat di Unit Penjaminan Mutu Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah merelakan sebagian waktu tugas saya untuk menyelesaikan disertasi ini.

Teman-teman Program Doktor angkatan 2000/2001, Program Studi Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Program Studi Ilmu Kedokteran, saya sampaikan terimakasih atas kebersamaannya untuk saling memberikan semangat dan dorongan. Semoga persahabatan ini dapat terus terbina.

Istriku tercinta, Hariyani serta anak-anakku tersayang : Rizki Imayani Mustofa dan Rheza Imawan Mustofa, saya sampaikan terimakasih atas kesabaran kalian merelakan sebagian waktu keluarga untuk menyelesaikan Program Doktor ini.

Fihak-fihak lain yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah membantu selama penelitian berlangsung, memberikan dorongan dan semangat, saya sampaikan terimakasih dan penghargaan setinggi-tingginya.

Semoga Allah, Tuhan yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang senantiasa melimpahkan rahmad dan karunia-Nya sebagai imbalan amal dan budi baik mereka. Amien.

RINGKASAN

IDENTIFIKASI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI RESEPTOR FERTILISASI (ZONA PELUSIDA-3) KAMBING SEBAGAI KANDIDAT BAHAN IMUNOKONTRASEPSI

Penelitian Eksploratif Laboratorik dan Fertilisasi *in vitro* pada Hewan Model

Imam Mustofa

Penelitian imunokontrasepsi telah dilakukan pada sejumlah spesies, namun belum pernah dilakukan pada kambing. Sebagaimana diketahui sampai saat ini kontrasepsi hormonal mempunyai efek samping. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa *crude* zona pelusida kambing efektif menghambat kebuntingan pada mencit. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan protein reseptor fertilisasi kambing (gZP3) dan uji potensi imunokontraseptifnya secara *in-vitro* pada pada mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan model.

Pada penelitian pertama identifikasi dilakukan untuk mengetahui konstituen protein zona pelusida kambing, dilanjutkan dengan isolasi protein yang diduga sebagai reseptor fertilisasi, yaitu gZP3. Karakterisasi dimaksudkan untuk mengetahui massa molekul relatif (Mr), uji densitometri, uji imunogenisitas dan spesifisitas terhadap antibodi asal mencit (*Mus musculus*) dan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) serta uji imunofluoresen. Pada penelitian kedua dilakukan uji fertilisasi *in vitro*, untuk membuktikan bahwa isolat yang diperoleh benar-benar *sperm receptor* kambing. Isolat gZP3 disuplementasikan pada media kapasitasasi spermatozoa kambing, sedangkan antibodi gZP3 disuplementasikan pada media maturasi oosit kambing, selanjutnya masing-masing secara terpisah dilakukan fertilisasi *in vitro*. Pada penelitian ketiga, antibodi gZP3 disuplementasikan dalam media untuk inkubasi oosit, selanjutnya dilakukan uji fertilisasi *in-vitro* dan uji *Binding (Binding assay)* pada oosit mencit.

Hasil penelitian pertama menunjukkan bahwa zona pelusida kambing terdiri dari tiga konstituen, yaitu gZP1, gZP2, dan gZP3 dengan massa molekul relatif (Mr) berturut-turut 120, 94, dan 82 kDa. Analisis Densitometri gel hasil SDS-Page menunjukkan bahwa masing-masing *band* gZP1, gZP2, dan gZP3

pada gel sesuai dengan puncak-puncak densitograf. Berdasarkan luas daerah di bawah kurva densitograf, komposisi gZP1, gZP2 dan gZP3 berturut-turut adalah 6,93 %, 29,60 % dan 63,47 %. Uji SDS-PAGE ulang dan analisis Densitometri menunjukkan bahwa protein yang diisolasi adalah benar dari *band* ketiga (gZP3) hasil SDS-PAGE protein zona pelusida kambing. Protein gZP3 bersifat imunogenik pada mencit (*Mus musculus*) betina dan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan, menghasilkan titer antibodi ($p < 0,05$) setelah imunisasi. Analisis *Dot blot* menunjukkan bahwa protein gZP3 dapat dikenali oleh antibodi gZP3 asal mencit betina dengan intensitas lebih tinggi dibandingkan antibodi gZP3 asal kelinci jantan. Analisis imunofluoresen menunjukkan bahwa antibodi gZP3 dapat mengenali homogenat zona pelusida kambing, dan protein gZP3 dapat mengenali membran plasma spermatozoa kambing.

Penelitian kedua membuktikan bahwa isolat protein gZP3 merupakan reseptor fertilisasi. Uji biologis dengan teknik fertilisasi *in-vitro* : antibodi gZP3 dalam media maturasi oosit kambing maupun protein gZP3 dalam media kapasitas spermatozoa kambing menurunkan ($p < 0,05$) angka *cleavage*.

Penelitian ketiga menunjukkan potensi imunokontraseptif protein gZP3 pada hewan coba model. Antibodi gZP3 menghambat ($p < 0,05$) fertilisasi oosit mencit secara *in-vitro* dan menurunkan ($p < 0,05$) *Binding Index* antara spermatozoa dengan oosit mencit (*Mus musculus*).

Berdasarkan hasil-hasil penelitian di atas, disimpulkan bahwa isolat gZP3 penelitian ini adalah protein reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing. Protein gZP3 tersebut efektif sebagai bahan imunokontrasepsi pada mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan model. Penelitian lanjutan perlu dilakukan untuk menemukan peptida yang memiliki homologi sekuen asam amino gZP3 dengan ZP3 manusia (*Homo sapiens*), dan menguji potensi imunokontraseptifnya pada primata dengan pengamatan efek utama pada infertilitas serta, efek samping pada siklus menstruasi dan perubahan histologi ovariumnya. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pengujian peptida tersebut dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay*.

SUMMARY

IDENTIFICATION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FERTILIZATION RECEPTOR (ZONA PELLUSIDA-3) OF GOAT AS CANDIDATE OF IMMUNOCONTRACEPTION SUBSTANCE

Explorative Laboratoric Experiments and In-vitro Fertilization On Animal Model

Imam Mustofa

The researches of immunocontraception have done in several species, but haven't yet been done in goat. As well as known that hormonal contraception up to now is still having side effect. In preliminary study, crude of goat zona pellucida protein was effective prohibited of graviditation of mice. The aim of this study was to find the fertilization receptor protein of goat (gZP3) and to test of its immunocontraceptive potential in-vitro on mice (*Mus musculus*) as animal model.

The first research was conducted to identify protein constituent of goat zona pellucida, before continuing with an isolation of protein wich was predicted as fertilization receptor protein i.e. ZP3. The characterization was aimed to identify relative molecular mass (Mr), gauging with densitometry, test of immunogenicity and specificity on mice (*Mus musculus*) and rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and test of immunofluorescence. The second research was in-vitro fertilization of goat, to prove that obtained isolate was representing receptor of sperm. Isolate of gZP3 was incubated on goat sperm, while antibody of gZP3 was incubated on goat oocyte, then each of them was in-vitro fertilized separately. The third research, antibody of gZP3 supplemented into M-16 media for oocyte incubation, continued with in-vitro fertilization assay and Binding Assay on mice (*Mus musculus*) as model.

Results of identification, isolation and characterization of fertilization receptor at goat zona pellucida (gZP), showed that zona pellucida of goat consisted of three constituents that were gZP1, gZP2, and gZP3 with relative molecular mass (Mr) were 120, 94, and 82 kDa respectively. Gel analysis result

of SDS-PAGE with densitometry indicated that each band of gZP1, gZP2, and gZP3 were in accordance with the tops of densitograph. Based on the wide of area under curve of densitograph, composition gZP1, gZP2 and gZP3 were 6.93 %, 29.60 % and 63.47 % respectively. The results of gel analysis by using SDS-PAGE and densitometry indicated that isolate protein was true from the third band (gZP3) of SDS-PAGE result of goat zona pellucida protein. Protein of gZP3 was immunogenic on female mice and male rabbit, it could produce antibody ($p < 0,05$) after immunization. Result of dot blotting analysis showed that gZP3 protein could recognized gZP3 antibody of the female mice with higher intensity compared to gZP3 antibody of male rabbit. Immunofluorescence staining technique indicated that protein of gZP3 could recognize plasma membrane of goat sperm.

The second research indicated that gZP3 protein isolate was fertilization receptor in goat. Biological test by using in-vitro fertilization technique, antibody of gZP3 which was supplemented in the maturation media of goat oocyte in-vitro could decrease ($p < 0,05$) of cleavage rate. Protein of gZP3 which was supplemented in the capacitation media of goat sperms decreased ($p < 0,05$) of cleavage rate.

The third research indicated that by using in-vitro fertilization technique, antibody of gZP3 resulted in blocking of fertilization ($p < 0,05$), and decreasing ($p < 0,05$) The Binding Index between mice sperm and mice oocyte.

Based on the results of the research above, it was concluded that gZP3 isolate was fertilization receptor protein at the goat zona pellucida. This protein was effective as immunocontraceptive on mice (*Mus musculus*) as a model. Hence, it is suggested to conduct further research to find a peptide with amino acid sequence homology of gZP3 and human ZP3, and trial of its immunocontraceptive potency on primates to observe its main effect on infertility response and its side effects on menstruate cycle and ovarian histological changes. Further research is required to test its peptide by using Human sperm-oocyte binding assay or of Human Hemi zona assay.

ABSTRAK

IDENTIFIKASI, ISOLASI DAN KARAKTERISASI RESEPTOR FERTILISASI (ZONA PELUSIDA-3) KAMBING SEBAGAI KANDIDAT BAHAN IMUNOKONTRASEPSI

**Penelitian Eksploratif Laboratorik dan Fertilisasi *in vitro*
pada Hewan Model**

Imam Mustofa

Penelitian imunokontrasepsi telah dilakukan pada sejumlah spesies, namun belum pernah dilakukan pada kambing. Sebagaimana diketahui sampai saat ini kontrasepsi hormonal mempunyai efek samping. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa *crude* zona pelusida kambing efektif menghambat kebuntingan pada mencit. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan protein reseptor fertilisasi kambing (gZP3) dan uji potensi imunokontraseptifnya secara *in-vitro* pada pada mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan model.

Penelitian pertama terdiri dari SDS-PAGE protein zona pelusida kambing, isolasi, penghitungan massa molekul relatif, densitometri, dot blot, dan uji imunofluoresen protein gZP3. Penelitian kedua dilakukan uji fertilisasi *in-vitro*, untuk membuktikan bahwa isolat yang diperoleh adalah *sperm receptor* kambing. Isolat gZP3 disuplementasikan pada media kapasitasi spermatozoa kambing, sedangkan antibodi gZP3 disuplementasikan pada media maturasi oosit kambing, selanjutnya masing-masing secara terpisah dilakukan fertilisasi *in-vitro*. Penelitian ketiga, antibodi gZP3 disuplementasikan dalam media untuk inkubasi oosit, selanjutnya dilakukan uji fertilisasi *in-vitro* dan uji *Binding* pada oosit mencit (*Mus musculus*) sebagai model.

Penelitian pertama menunjukkan bahwa protein zona pelusida kambing terdiri dari tiga konstituen, yaitu gZP1, gZP2, dan gZP3 dengan massa molekul relatif (Mr) berturut-turut 120, 94, dan 82 kDa, dan dengan komposisi 6,93 29,60 dan 63,47 %. Hasil analisis *Dot blot* menunjukkan bahwa protein gZP3 dapat dikenali oleh antibodi gZP3 asal mencit betina dengan intensitas lebih tinggi dibandingkan antibodi gZP3 asal kelinci jantan. Analisis imunofluoresen menunjukkan bahwa protein gZP3 dapat mengenali membran plasma spermatozoa kambing. Penelitian kedua membuktikan bahwa isolat protein gZP3 merupakan reseptor fertilisasi. Uji biologis dengan teknik fertilisasi *in-vitro* : antibodi gZP3 dalam media maturasi oosit kambing maupun protein gZP3 dalam media kapasitasi spermatozoa kambing menurunkan ($p < 0,05$) angka *cleavage*. Penelitian ketiga menunjukkan bahwa antibodi gZP3 menghambat ($p < 0,05$) fertilisasi oosit mencit secara *in-vitro* dan menurunkan ($p < 0,05$) *Binding Index* antara spermatozoa dengan oosit mencit (*Mus musculus*).

Berdasarkan hasil penelitian di atas, disimpulkan bahwa isolat gZP3 adalah protein reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing yang efektif sebagai bahan imunokontrasepsi pada mencit (*Mus musculus*) sebagai model.

Kata Kunci : Zona pellucida-3 kambing, imunokontrasepsi, fertilisasi *in vitro*.

ABSTRACT

IDENTIFICATION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FERTILIZATION RECEPTOR (ZONA PELLUSIDA-3) OF GOAT AS CANDIDATE OF IMMUNOCONTRACEPTION SUBSTANCE

Explorative Laboratoric Experiments and In-vitro Fertilization On Animal Model

Imam Mustofa

The researches of immunocontraception have done in several species, but haven't yet been done in goat. As well as known that hormonal contraception up to now is still having side effect. In preliminary study, crude of goat zona pellucida protein was effective prohibited of graviditation of mice. The aim of this study was to find the fertilization receptor protein of goat (gZP3) and to test of its immunocontraceptive potential in-vitro on mice (*Mus musculus*) as animal model.

The first research was consist of SDS-PAGE of goat zona pellucida protein, isolation, calculation of relative molecular mass (Mr), densitometry, dot blotting and test of immunofluorescence of gZP3 protein. The second research was in-vitro fertilization, to prove that obtained isolate was representing fertilization receptor of goat. Isolate of gZP3 was incubated on goat sperm, while antibody of gZP3 was incubated on goat oocyte, then each of them was in-vitro fertilized separately. The third research, antibody of gZP3 supplemented into media for oocyte incubation, continued with in-vitro fertilization and binding assay on mice.

The result of the first research indicated that zona pellucida of goat consisted of three constituents that were gZP1, gZP2, and gZP3 with relative molecular mass 120, 94, and 82 kDa, and it composition were 6.93, 29.60 and 63.47 % respectively. Dot blotting analysis showed that gZP3 protein could recognized gZP3 antibody of the female mice with higher intensity compared to gZP3 antibody of male rabbit. Immunofluorescence staining technique indicated that protein of gZP3 could recognize plasma membrane of goat sperm. Secondly research indicated that gZP3 protein isolate was the receptor of fertilization. Biologic test by using in-vitro fertilization technique : antibody of gZP3 which was supplemented in maturation media of goat oocyte of in-vitro decreased ($p < 0,05$) of the cleavage rate. Protein of gZP3 which was supplemented in capacitation media of goat sperm could also decreased ($p < 0.05$) the cleavage rate. The third research indicated that by using in-vitro fertilization technique, antibody of gZP3 blocked ($p < 0.05$) the fertilization, and decreased ($p < 0.05$) The Binding Index between mice sperm and mice oocytes.

The results of this study concluded that gZP3 protein isolate was the fertilization receptor protein at the goat zona pellucida. This protein was effective as immunocontraceptive on mice (*Mus musculus*) as an animal model.

Key Words : Goat zona pellucida 3, immunocontraception, *in-vitro* fertilization

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	I
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
RINGKASAN	viii
SUMMARY	x
ABSTRAK	xii
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR	xxi
DAFTAR LAMPIRAN	xxiii
DAFTAR SINGKATAN	xxiv
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Permasalahan	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan umum	6
1.3.2 Tujuan khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	7
1.4.1 Manfaat teoritis	7
1.4.1 Manfaat praktis	8

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Kontrasepsi	9
2.1.1	Imunokontrasepsi	10
2.1.2	Mekanisme Imunokontrasepsi	15
2.2	Respon Imun	17
2.2.1	Berdasarkan waktu pemaparan	19
2.2.2	Berdasarkan mekanisme efektor.	22
2.3	Zona Pelusida	26
2.3.1	Fungsi fisiologis	27
2.3.2	Asam amino ZP3	33
2.3.3	<i>O-linked oligosaccharida</i>	36
2.3.4	Uji reseptor pada zona pelusida	39

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	48
3.2	Hipotesis Penelitian	52

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Penelitian I :	
	Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Zona Pelusida Kambing (<i>goat zona pelucida 3, gZP3</i>)	54
4.1.1	Bahan dan alat penelitian	54
4.1.2	Prosedur pengumpulan data	56
	a Identifikasi dan isolasi reseptor fertilisasi	57
	b Karakterisasi gZP3	60

4.2	Penelitian II :	
	Uji <i>Binding</i> Antibodi dan Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i>	69
4.2.1	Rancangan Penelitian	69
4.2.2	Populasi, Sampel dan Besar Sampel	71
4.2.3	Variabel Penelitian	72
4.2.4	Definisi Operasional Variabel	72
4.2.5	Bahan Penelitian	73
4.2.6	Prosedur Pengumpulan Data	73
4.2.7	Analisis Data	77
4.3	Penelitian III :	
A	Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i> pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	78
4.3.1	Rancangan Penelitian	78
4.3.2	Populasi, Sampel dan Besar Sampel	78
4.3.3	Variabel Penelitian	80
4.3.4	Definisi Operasional Variabel	80
4.3.5	Bahan Penelitian	81
4.3.6	Prosedur Pengumpulan Data	81
4.3.7	Analisis Data	83
B	Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik <i>Binding Assay</i> pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	84

4.4.1	Rancangan Penelitian	84
4.4.2	Populasi, Sampel dan Besar Sampel	84
4.4.3	Variabel Penelitian	85
4.4.4	Definisi Operasional Variabel	86
4.4.5	Bahan Penelitian	86
4.4.6	Prosedur Pengumpulan Data	86
4.4.7	Analisis Data	88
BAB 5	HASIL PENELITIAN	68
5.1	Penelitian I :	
	Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing	89
5.1.1	Identifikasi dan Isolasi Konstituen gZP	89
5.1.2	Karakterisasi gZP3	92
5.2	Penelitian II :	
	Uji <i>Binding</i> Antibodi dan Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i>	112
5.3	Penelitian III :	
A.	Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i> pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	113
5.3.1	Titer Antibodi gZP3 Sebelum dan Setelah Imunisasi	113
5.3.2	Hasil fertilisasi <i>in vitro</i> Mencit (<i>Mus musculus</i>) ..	114

B. Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik <i>Binding Assay</i> pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	120
--	-----

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing	121
6.2 Uji <i>Binding</i> Antibodi dan Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i>	137
6.3. 1 Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik Fertilisasi <i>in vitro</i> pada Oosit Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	151
6.3. 2 Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik <i>Binding Assay</i> pada Oosit Mencit (<i>Mus musculus</i>) sebagai Model	157

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan	163
7.2 Saran	164

DAFTAR PUSTAKA	166
-----------------------------	-----

LAMPIRAN	175
-----------------------	-----

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Persentase Homologi Asam Amino Penyusun ZP3 pada Beberapa Spesies Mamalia	34
Tabel 4.1	Karakterisasi gZP3 dan Antibodi gZP3 terhadap Spermatozoa dan Zona Pelusida Kambing	66
Tabel 4.2	Rancangan Penelitian Pengaruh Antibodi gZP3 dan Antigen gZP3 pada Fertilisasi <i>in vitro</i> Kambing	69
Tabel 4.3	Rancangan Penelitian Pengaruh Antibodi gZP3 pada Oosit Mencit (<i>Mus musculus</i>) dalam Fertilisasi <i>in vitro</i>	78
Tabel 4.4	Rancangan Penelitian <i>Binding Assay</i> pada Oosit dan Spermatozoa Mencit (<i>Mus musculus</i>)	84
Tabel 5.1	Statistik Deskriptif Konstituen Zona Pelusida Kambing	94
Tabel 5.2	Rerata, Standar Deviasi dan Persentase Luas Daerah Di Bawah Kurva Densitograf Konstituen Zona Pelusida Kambing	98
Tabel 5.3	Titer Antibodi Mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah Imunisasi dengan gZP3	101
Tabel 5.4	Titer antibodi kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3.	103
Tabel 5.5	Angka <i>Cleavage</i> embrio kambing setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit dan penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa.	110
Tabel 5.6	Titer antibodi serum mencit (<i>Mus musculus</i>) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing	113
Tabel 5.7	Ringkasan data hasil fertilisasi <i>in vitro</i> oosit mencit (<i>Mus musculus</i>) dengan inkubasi dalam <i>pre immune serum</i> (Kontrol) dan <i>post immune serum</i> (Perlakuan)	115

Tabel 5.8 Ringkasan data hasil *Binding Assay* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam serum *pre immune* (Kontrol) dan serum *post immune* (Perlakuan) 117



DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Diagram alir bekerjanya IgG pada Zona pelusida	16
Gambar 2.2	Respon imun primer dan sekunder	20
Gambar 2.3	Diagram Skematis Struktur Immunoglobulin	21
Gambar 2.4	Diagram Skematis Molekul Antibodi dan <i>Antigenic Binding Site</i>	22
Gambar 2.5	Respon imun humoral	24
Gambar 2.6	Struktur tiga dimensi ZP1, ZP2 dan ZP3 pada mencit	27
Gambar 2.7	Tahap-tahap awal fertilisasi pada mamalia	28
Gambar 2.8	Diagram skematis interaksi awal gamet mamalia	30
Gambar 2.9	Diagram Skematis Reaksi Kortikal	32
Gambar 2.10	Komposisi <i>O-linked</i> dan <i>N-linked</i> Oligosakarida	37
Gambar 2.11	Struktur Molekul <i>O-linked GalNAc</i> dan <i>GlcNAc</i>	39
Gambar 3.1	Kerangka Konseptual Penelitian	51
Gambar 4.1	Kerangka Operasional Penelitian Tahap Pertama	55
Gambar 4.2	Kerangka Operasional Penelitian Tahap Kedua	70
Gambar 4.3	Kerangka Operasional Penelitian Tahap Ketiga	79
Gambar 5.1	Hasil Koleksi Zona Pelusida Kambing.	90
Gambar 5.2	Hasil SDS-PAGE Zona Pelusida Kambing	91
Gambar 5.3	Plot Kurva Nilai Logaritma Massa Molekul Relatif Protein Marker <i>High Range Standard</i> terhadap Mobilitas Relatif Molekul Protein dalam SDS-PAGE 12 %.	93
Gambar 5.4	Konfirmasi Hasil Isolasi gZP3 dengan SDS-PAGE	94

Gambar 5.5.a	Konfirmasi Marker Hasil SDS-PAGE terhadap Densitografinya	96
Gambar 5.5.b	Konfirmasi Hasil SDS-PAGE gZP terhadap Densitografinya	97
Gambar 5.5.c	Konfirmasi Hasil SDS-PAGE Ulang Isolat gZP3 terhadap Densitografinya	99
Gambar 5.6	Diagram Persentase Proporsi Konstituen Protein Zona Pelusida Kambing berdasarkan Densitometri Gel Hasil SDS-PAGE	100
Gambar 5.7	Titer Antibodi serum Mencit (<i>Mus musculus</i>) Kelompok Kontrol dan Perlakuan Imunisasi dengan 40 μ gZP3	102
Gambar 5.8	Rerata Titer Antibodi Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) jantan sebelum (Pre Imun) dan setelah imunisasi (Post Imun) dengan gZP3	104
Gambar 5.9	Analisis Dot Blot Protein gZP3 terhadap Serum Asal Mencit (<i>Mus musculus</i>) dan Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	105
Gambar 5.10	Analisis Imunofluoresen Natif gZP3 terhadap Antibodi gZP3 dan Spermatozoa Kambing	107
Gambar 5.11	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> pada Kambing setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit (Antibodi) dan penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa (Antigen)	111
Gambar 5.12	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> oosit kambing (<i>Capra hircus</i>)	112
Gambar 5.13	Titer Antibodi Serum Mencit (<i>Mus musculus</i>) Sebelum dan Setelah Penyuntikan dengan Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3).	114
Gambar 5.14	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> Oosit Mencit (<i>Mus musculus</i>)	116
Gambar 5.15	Hasil <i>Binding Assay</i> pada Oosit Mencit dengan inkubasi dalam serum <i>pre immune</i> dan serum <i>post immune</i>	119
Gambar 5.16	Gambaran <i>Binding Assay</i> Oosit Mencit (<i>Mus musculus</i>) .	120

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Mikrobiometri zona pelusida kambing	175
Lampiran 2	Perhitungan massa molekul relatif gZP3 menggunakan persamaan regresi linier.	176
Lampiran 3	Luas Daerah Di Bawah Kurva Densitometri	177
Lampiran 4	Titer Antibodi Mencit (<i>Mus musculus</i>) setelah Imunisasi dengan gZP3	178
Lampiran 5	Titer Antibodi Kelinci (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) sebelum dan setelah Imunisasi dengan gZP3.	180
Lampiran 6	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> pada Kambing	182
Lampiran 7	Titer Antibodi Serum Mencit mencit (<i>Mus musculus</i>) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3.	184
Lampiran 8	Hasil Fertilisasi <i>in vitro</i> pada mencit (<i>Mus musculus</i>).	186
Lampiran 9	Hasil <i>Binding Assay</i> pada mencit (<i>Mus musculus</i>).	187
Lampiran 10	Susunan Asam Amino ZP3 Beberapa Spesies	188

DAFTAR SINGKATAN

A ^o	: Angstrom
A ²	: Angstrom persegi
Ab-gZP3	: Antibodi Goat Zona Pellucida-3
Ab _I	: Antibodi primer
Ab _{II}	: Antibodi sekunder
Ag	: Antigen
AP	: Alkaline Phosphatase
APC	: Antigen Presenting Cells
APS	: Ammonium Peroxo Sulphate
BKKBN	: Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional
BSA	: Bovine Serum Albumin
bZP	: Bovine zona pellucida
CD4 ⁺	: Cluster of Differentiation
CFA	: Complete Freund Adjuvant
C _H	: Constant region - High chain
C _L	: Constant region - Light chain
CO ₂	: Karbon Dioksida
EBP	: Egg Binding Protein
EBSS	: Earle's Balanced Salt Solution
Elisa	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	: Foetal Calf Serum
FITC	: Fluorescence Iso Thio Cyanate
FIV	: Fertilisasi In Vitro
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GalNAc	: <i>N-acetylglucosamine</i>
GlcNAc	: <i>N-acetylgalactosamine</i>
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
GST	: Glutathione S Transferase
GVBD	: Germinal Vesicle Break Down



gZP	: Goat Zona Pellucida
gZP1	: Goat Zona Pellucida-1
gZP2	: Goat Zona Pellucida-2
gZP3	: Goat Zona Pellucida-3
hCG	: Human Chorionic Gonadotropin
IAM	: Inner Acrosomal Membrane
IFA	: Incomplete Freund Adjuvant
Ig	: Immunoglobulin
iu	: International unit
K	: Kontrol
kDa	: Kilo Dalton
kHz	: Kilo Hertz
KOK	: Kompleks Oosit Kumulus
LH	: Luteinizing Hormone
Log Mr	: Logaritma terhadap nilai Mr
mA	: Milli Ampere
MHC	: Major Histocompatibility Complex
Mr	: Massa molekul relatif
NM	: Nuclear Membrane
nm	: Nano meter
OAM	: Outer Acrosomal Membrane
OWS	: Oocyte Washing Solution
P I	: Perlakuan pertama
P II	: Perlakuan kedua
PBS	: Posphate Buffer Saline
PM	: Plasma Membrane
PMSG	: Pregnant Mare Serum Gonadotropin
pZP	: Porcine Zona Pellucida
Rf	: Refractory factor
rFA-1	: Recombinant of Fertilizing Antigen-1
RPH	: Rumah Potong Hewan

SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphuric acid - Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SPSS	: Statistical Product and Service Solution
SNARE	: Soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
Spz	: Spermatozoa
TCM	: Tissue Culture Medium
TDC	: Tropical Disease Center
TEMED	: N,N,N,N-Tetra Methyl Ethylen Diamin
µm	: Micro meter
V _H	: Variable region – Heavy chain
V _L	: Variable region - Light chain
WHO	: World Health Organization
ZP	: Zona Pelusida
ZP1	: Zona Pelusida-1
ZP2	: Zona Pelusida-2
ZP3	: Zona Pelusida-3
ZPA	: Zona Pelusida-A
ZPB	: Zona Pelusida-B
ZPC	: Zona Pelusida-C

Singkatan Asam Amino dengan sistem satu huruf dan tiga huruf :

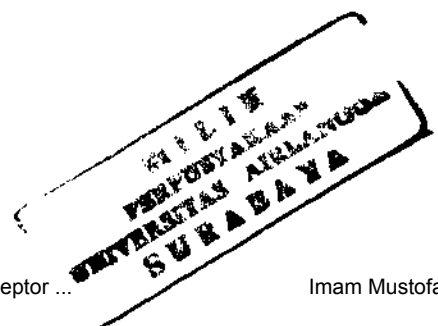
A (Ala)	: Alanine	M (Met)	: Methionine
C (Cys)	: Cysteine	N (Asn)	: Asparagine
D (Asp)	: Aspartic acid	P (Pro)	: Proline
E (Glu)	: Glutamic acid	Q (Gln)	: Glutamine
F (Phe)	: Phenylalanine	R (Arg)	: Arginine
G (Gly)	: Glycine	S (Ser)	: Serine
H (His)	: Histidine	T (Thr)	: Threonine
I (Ile)	: Isoleucine	V (Val)	: Valine
K (Lys)	: Lysine	W (Trp)	: Tryptophan
L (Leu)	: Leucine	Y (Tyr)	: Tyrosine

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Permasalahan

Majalah *Population Report* tahun 1992 memprediksi bahwa penduduk dunia pada akhir tahun 2002 adalah sebesar 6.362 juta jiwa, namun kenyataannya saat ini berjumlah 6.330 juta jiwa. Hal sebaliknya terjadi pada penduduk Indonesia, yang diprediksi 214 juta jiwa ternyata justru lebih tinggi, yaitu 228 juta jiwa (Hartanto, 2002). Kenyataan tersebut sesuai dengan data tahun 2002 yang menunjukkan bahwa peserta Keluarga Berencana (KB) aktif adalah sebesar 67,6 % (BKKBN, 2002). Berdasarkan data tersebut berarti terdapat 32,4 % pasangan usia subur (PUS) tidak mengikuti Program KB, yang berpotensi menimbulkan ledakan jumlah penduduk di masa depan. Keadaan populasi penduduk yang besar dapat menimbulkan masalah serius dalam hal penyediaan pangan dan gizi, perumahan, kesehatan, lingkungan hidup serta sumber daya alam (Hartanto, 2002).

Metode kontrasepsi yang dipakai penduduk Indonesia sebagian besar adalah metode kontrasepsi yang menggunakan bahan hormonal, yaitu metode suntikan 59,28 %, pil 28,39 %, dan implan 4,24 % (BKKBN, 2002). Bahan kontrasepsi hormonal yang digunakan pada umumnya adalah hormon steroid, yaitu progesteron atau kombinasinya dengan estrogen. Hormon reproduksi eksogen tersebut dimaksudkan dengan sengaja untuk mengganggu fungsi fisiologis poros endokrin : hipotalamus – hipofisis – ovarium agar tidak terjadi ovulasi (Hartanto, 2002).



Penelitian metode kontrasepsi alternatif dengan prinsip imunologi yaitu dengan memanfaatkan protein imunogenik gamet dilakukan untuk menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi. Sistem kontrasepsi ini berupa injeksi suatu bahan imunogen yang diharapkan menghasilkan antibodi untuk secara langsung mencegah konsepsi. Bahan imunogen tersebut dapat berasal dari spermatozoa, oosit atau zona pelusida (Baird dan Glasier, 1999).

Imunisasi kontrasepsi di masa mendatang akan menjadi suplemen yang penting pada program KB. Imunisasi kontrasepsi diharapkan mempunyai spesifisitas yang tinggi (hanya bekerja pada gamet), tidak bereaksi dengan sel somatis (Barber dan Fayer-Hosken, 2000). Selain itu, efek samping yang rendah, harga yang lebih murah dan pemakaiannya tidak sesering preparat kontrasepsi hormonal yang ada saat ini (Paterson *et al*, 2002).

Salah satu bahan imunokontrasepsi yang potensial adalah zona pelusida, yaitu lapisan glikoprotein pembungkus oosit yang sedang tumbuh atau sel telur yang telah mengalami ovulasi. Zona pelusida pada oosit mamalia antara lain berfungsi dalam pengenalan awal dan sebagai pengikat spermatozoa terhadap oosit sehingga memainkan peranan penting pada proses fertilisasi (Rankin dan Dean, 2000). Zona pelusida mengandung sejumlah antigenik determinan termasuk karbohidrat, protein, dan konformasi-konformasi epitopnya. Immunogenesitas kompleks glikoprotein ini bervariasi (Skinner *et al.*, 1999), namun terdapat homologi susunan asam amino antar protein zona pelusida pada mamalia (Zhu dan Naz, 1999).

Zona pelusida mamalia terdiri dari dua, tiga atau empat konstituen, namun pada umumnya mengandung tiga macam konstituen protein terglykosilasi yang berdasarkan nomenklatur disebut sebagai Zp1, ZP2, dan Zp3 (McCartney dan Mate, 1999 ; Wassarman *et al*, 2001). Di antara komponen-komponen glikoprotein tersebut, ZP3 berperan penting dalam fertilisasi karena ZP3 berfungsi sebagai reseptor primer pengenalan terhadap spermatozoa. Oleh karena itu, di antara komponen-komponen ZP tersebut, ZP3 merupakan antigen yang potensial untuk target imunokontrasepsi (McCartney dan Mate, 1999 ; Sumitro dan Aulanni'am, 2001).

Keberhasilan imunokontrasepsi ditentukan oleh kemampuan bahan imunogen tersebut untuk mencegah fertilisasi tanpa menimbulkan pengaruh pada poros endokrin hipotalamus – hipofisis – ovarium. Sebagai bahan imunisasi kontrasepsi masa depan, percobaan imunisasi pada hewan dengan menggunakan zona pelusida diharapkan tidak menimbulkan perubahan pada siklus birahi, profil hormonal, dan perkembangan folikel pada ovariumnya (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000). Namun, kenyataannya, harapan-harapan tersebut sampai saat ini belum dapat diwujudkan sehingga penelitian-penelitian dan pengujian-pengujian tersebut sampai saat ini juga belum mencapai tahap produksi imunogen kontrasepsi secara komersial.

Penelitian-penelitian tentang imunokontrasepsi zona pelusida sampai saat ini belum mencapai produk akhir yang siap dipasarkan. Hal ini disebabkan masih adanya kontroversi terhadap efek samping yang ditimbulkannya berupa

patologi ovarium. Penekanan terhadap fertilitas setelah imunisasi hewan coba pada beberapa penelitian, ternyata menyebabkan efek samping terjadinya gangguan fungsi ovarium berupa hambatan folikulogenesis dan percepatan penurunan jumlah folikel primordial yang bersifat irreversibel. Pada wanita, gangguan folikulogenesis tersebut akan menyebabkan perubahan profil endokrin reproduksi yang selanjutnya berakibat pada perubahan siklus haid, sedangkan percepatan pengurangan sel-sel benih akan menyebabkan menopause lebih dini (Paterson *et al*, 2002).

Penggunaan ZP3 babi pada masyarakat muslim dapat menimbulkan masalah sosial tersendiri. Sedangkan penelitian menggunakan ZP3 sapi di Indonesia dihadapkan pada kendala adanya peraturan yang melarang pemotongan hewan besar betina bertanduk yang masih produktif, sehingga relatif sulit mendapatkan ovarium sapi.

Zona pelusida kambing sebagai bahan antifertilitas sampai saat ini belum pernah diteliti oleh pihak lain. Penelitian pendahuluan imunisasi hewan coba menggunakan *crude* zona pelusida kambing (*goat zona pellucida*, gZP) ternyata dapat mencegah kebuntingan dan tidak menyebabkan perubahan populasi folikel primer (Mustofa *dkk*, 2001). Sehubungan dengan hal tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menguji potensi imunokontrasepsi zona pelusida-3 kambing (gZP3) pada hewan coba model yang kelak diharapkan dapat dikembangkan menjadi bahan dasar bahan kontrasepsi alternatif pada Program Keluarga Berencana.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan hal-hal tersebut di atas, maka dilakukan penelitian kualitatif eksploratif laboratorik untuk mengidentifikasi, mengisolasi dan karakterisasi protein gZP3 dari zona pelusida kambing. Isolat protein gZP3 yang diperoleh selanjutnya dipakai sebagai bahan dalam penelitian eksperimental. Rumusan masalah yang diajukan pada penelitian eksperimental adalah :

- 1.2.1. apakah isolat protein gZP3 yang diperoleh tersebut merupakan reseptor fertilisasi, sehingga :
 - a. antibodi gZP3 memblok kemampuan oosit kambing untuk dibuahi pada teknik fertilisasi *in vitro*?
 - b. protein gZP3 memblok kemampuan spermatozoa kambing untuk membuahi oosit kambing pada teknik fertilisasi *in vitro* ?
- 1.2.2. apakah protein gZP3 mempunyai potensi imunokontrasepsi pada hewan coba model, sehingga :
 - a. antibodi gZP3 dapat memblok kemampuan oosit hewan coba mencit (*Mus musculus*) untuk mencegah pembuahan *in vitro* ?
 - b. antibodi gZP3 dapat memblok kemampuan oosit hewan coba mencit (*Mus musculus*) untuk mencegah ikatannya dengan spermatozoa dalam *Binding Assay* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

- a. Melakukan identifikasi, isolasi dan karakterisasi protein reseptor fertilisasi pada zona pelusida-3 kambing.
- b. Menguji potensi imunokontrasepsi zona pelusida-3 kambing pada mencit (*Mus musculus*) sebagai model secara *in vitro*.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui jumlah konstituen zona pelusida kambing, menghitung massa molekul relatif (Mr) dan menemukan proporsi massa masing-masing konstituen yang sampai saat ini belum diketahui, serta menguji spesifisitas antibodinya dengan metode *Dot Blotting*.
- b. Membuktikan bahwa isolat gZP3 merupakan protein reseptor yang dapat mengenali spermatozoa kambing dengan teknik imunofluoresen.
- c. Membuktikan bahwa isolat gZP3 merupakan protein reseptor fertilisasi, sehingga antibodi gZP3 dapat menghambat kemampuan oosit kambing untuk dibuahi oleh spermatozoa secara *in vitro* yang diukur berdasarkan *Angka Cleavage*.

- d. Membuktikan bahwa isolat gZP3 merupakan protein reseptor fertilisasi yang dapat menghambat kemampuan spermatozoa kambing membuahi oosit secara *in vitro* yang diukur berdasarkan *Angka Cleavage*.
- e. Menguji kemampuan antibodi hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan gZP3 dalam menghambat fertilisasi *in vitro* pada oosit mencit (*Mus musculus*) sebagai model.
- f. Menguji kemampuan antibodi hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan gZP3 dalam mencegah ikatan (*Binding*) secara *in vitro* antara spermatozoa dengan oosit mencit (*Mus musculus*) sebagai model.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menyediakan informasi tentang zona pelusida kambing yang selama ini belum pernah diteliti. Informasi tersebut meliputi konstituen zona pelusida kambing berikut massa molekul relatif dan proporsi massa masing-masing, imunogenisitas dan spesifisitasnya, peranan gZP3 sebagai reseptor fertilisasi kambing, serta potensi protein gZP3 sebagai bahan imunokontrasepsi pada hewan coba model.

1.4.2. Manfaat Praktis

1.4.2.a. Memanfaatkan zona pelusida kambing sebagai kandidat bahan dasar imunokontrasepsi.

1.4.2.b. Menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi untuk mengendalikan jumlah penduduk di masa depan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

Masalah kependudukan merupakan masalah serius di era modern ini, sebab sangat terkait dengan penyediaan bahan makanan, pakaian dan tempat tinggal. Perkembangan jumlah penduduk dalam suatu negara yang tidak terkendali akan berdampak pada timbulnya permasalahan-permasalahan sosial, kelestarian sumber daya alam dan lingkungan hidup. Solusi dari masalah tersebut adalah dilaksanakannya program Keluarga Berencana (KB), yang bertujuan untuk mewujudkan kesehatan ibu dan anak serta keluarga yang sejahtera dan bahagia. Program KB dilaksanakan antara lain dengan penyediaan berbagai variasi metode kontrasepsi (alat atau obat kontrasepsi, Alokon) agar pasangan usia subur mempunyai berbagai pilihan untuk mendapatkan metode yang dianggap paling sesuai.

2.1 Kontrasepsi

Kontrasepsi berasal dari kata kontra dan konsepsi, yang berarti melawan atau menghambat terjadinya pembuahan (konsepsi) sel telur oleh spermatozoa dengan tujuan untuk mencegah kehamilan (Baird dan Glasier, 1999). Metode kontrasepsi dapat diterapkan pada wanita maupun pada pria, namun sebagian besar diperuntukkan bagi wanita. Hal ini disebabkan pada wanita hanya menghasilkan satu sel telur dalam satu siklus menstruasi sehingga apabila satu sel telur tersebut telah dihambat maka fertilisasi gagal terjadi. Sebaliknya pada

pria tanpa dipengaruhi oleh suatu siklus tertentu, dan setiap kali ejakulasi secara normal mengeluarkan berjuta-juta sel spermatozoa.

Selanjutnya metode kontrasepsi yang dibahas adalah kontrasepsi untuk wanita, baik kontrasepsi konvensional yang telah dipakai masyarakat selama ini maupun metode imunokontrasepsi yang sedang dikembangkan.

Bahan yang dapat digolongkan sebagai kontrasepsi konvensional dapat bekerja pada berbagai posisi, yaitu poros hipotalamus - hipofisis anterior - ovarium, tuba Fallopii, uterus dan vagina. Bahan kontrasepsi yang bekerja pada poros hipotalamus - hipofisis mempunyai aktivitas pada gonad dengan mekanisme umpan balik negatif. Pada hipotalamus antifertilitas tersebut bekerja menurunkan *Gonadotropin Releasing Hormone* (Gn-RH), yang akan berpengaruh untuk menurunkan pelepasan *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) dari hipofisis anterior, sehingga menghambat pembentukan dan pematangan folikel serta proses ovulasi. Bahan kontrasepsi yang bekerja pada tuba Fallopii mempengaruhi transportasi ovum maupun spermatozoa sehingga mencegah terjadinya fertilisasi (Baird dan Glasier, 1999).

2.1.1 Imunokontrasepsi

Metode kontrasepsi yang saat ini sedang diteliti adalah metode kontrasepsi yang menggunakan prinsip imunologi, yaitu metode imunokontrasepsi. Imunokontrasepsi dilakukan dengan penyuntikan protein imunogenik gamet berupa sperma, oosit, atau zona pelusida.

Imunisasi suatu individu dengan bahan imunogen diharapkan menghasilkan respon imun humoral berupa antibodi untuk secara langsung mencegah konsepsi (Martinez dan Harris, 2000). Bahan imunokontrasepsi dipersyaratkan memiliki sifat reversibel, efisiensi tinggi, tidak menimbulkan efek samping, aplikasinya mudah, jumlah pemberiannya sedikit, aktivitas panjang sekurang-kurangnya satu tahun, dan harga terjangkau (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Salah satu bahan yang potensial sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi adalah zona pelusida. Hal ini disebabkan zona pelusida memainkan peran penting untuk memulai interaksi antara sel spermatozoa dengan sel telur. Pemblokkan reseptor fertilisasi pada zona pelusida secara imunologis akan mencegah konsepsi (Greenhouse *et al*, 1999 ; Harris *et al*, 1999 ; Tsubamoto *et al*, 1999).

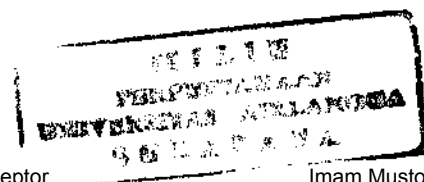
Penelitian tentang imunokontrasepsi yang telah banyak dilakukan adalah menggunakan ZP3 babi (*porcine zona pellucida-3*, pZP3) dan ZP3 sapi (*bovine zona pellucida-3*, bZP3) (Sumitro dan Aulanni'am, 2001). Beberapa zona pelusida spesies lain yang diteliti adalah zona pelusida mencit (*Mus musculus*), manusia (*Homo sapiens*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), Tikus (*Rattus norvegicus*) dan kera Bonnet (*Macaca radiata*) (Skinner *et al*, 1999 ; Rankin dan Dean, 2000). Protein zona pelusida tersebut telah diimunisasikan pada hewan coba dalam bentuk ZP3 *natif* (Paterson *et al*, 1999), protein ZP3 rekombinan (Paterson *et al*, 2002),

maupun menggunakan protein ZP3 deglikosilasi (Henderson *et al*, 1987a ; Henderson *et al*, 1987b ; Dunbar *et al*, 1989 ; Milletich dan Broze, 1990 ; Paterson *et al*, 1992 ; Aulanni'am, 2003 ; Aulanni'am *et al*, 2003).

Barber dan Fayrer-Hosken (2000) menyebutkan bahwa pengujian antifertilitas menggunakan ZP babi maupun sapi telah banyak dilakukan pada rodensia, kuda, anjing, primata, dan gajah. Bahan ZP dapat dipakai sebagai imunisasi untuk mengendalikan populasi satwa liar di habitatnya. Penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Miller *et al* (1999) pada rusa, Fayrer-Hosken *et al* (1999) pada gajah Afrika, serta Martinez dan Harris (2000) pada kera baboon telah membuktikan peranan preparat ZP natif maupun rekombinannya untuk menimbulkan infertilitas.

Respon antifertilitas setelah imunisasi hewan coba dengan bahan yang berasal dari zona pelusida pada beberapa penelitian, ternyata menyebabkan efek samping hambatan folikulogenesis dan percepatan erosi folikel primordial yang bersifat irreversibel (Paterson *et al*, 2002). Efek samping tersebut selanjutnya berakibat pada terganggunya profil hormonal, perubahan siklus birahi, dan menopause dini pada hewan coba. Efek samping demikian dilaporkan terjadi pada kelinci, anjing dan kuda, atau siklus menstruasi pada primata (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Pada penelitian pendahuluan, imunisasi mencit (*Mus musculus*) betina dengan preparat *crude* zona pelusida kambing lokal dalam Freund



adjuvant, ternyata mencegah kebuntingan hewan coba. Pemeriksaan histologis ovarium hewan coba menunjukkan adanya penurunan jumlah folikel sekunder sampai dengan folikel de Graaf, sedangkan folikel primer dan korpus luteum tidak berubah. Folikel primer tidak terganggu karena pada folikel tersebut oogonium belum dilapisi oleh zona pelusida sehingga tidak menjadi target dari antibodi yang terbentuk akibat imunisasi. Korpus luteum yang ada diyakini sebagai sisa korpus luteum siklus sebelumnya yang tidak mengalami regresi. Korpus luteum tidak mengalami regresi disebabkan terganggunya fisiologi endokrin akibat tidak berkembangnya folikel. Perubahan struktur histologis ovarium tersebut diikuti pula dengan perubahan siklus birahi (Mustofa dkk, 2001).

Terjadinya efek samping yang tidak diinginkan pada penelitian pendahuluan di atas ternyata sama dengan laporan Paterson *et al* (2000), yaitu terjadinya patologi ovarium yang ditandai dengan gangguan folikulogenesis, namun pada penelitian pendahuluan tersebut tidak disertai penekanan terhadap *primordial follicle pool*. Menurut Lindau-Shepard *et al* (2001) dalam perkembangan folikel terdapat reseptor FSH di permukaan zona pelusida sehingga folikulogenesis terganggu. Reseptor tersebut dapat mengalami blokade oleh antibodi dengan dilakukannya imunisasi menggunakan preparat *crude* zona pelusida.

Oleh karena itu, imunisasi yang menggunakan komponen zona pelusida kambing yang hanya berperan dalam pengenalan terhadap

spermatozoa, yang diduga adalah zona pelusida 3 (ZP3), diyakini akan menimbulkan respon imun yang bekerja sebagai kontrasepsi tanpa diikuti oleh timbulnya efek samping pada siklus perkembangan folikel maupun siklus birahi. Hasil penelitian ternyata memberikan kenyataan seperti harapan di atas. Infertilitas pada hewan coba setelah imunisasi dengan gZP3 (*goat zona pellicida 3*) bersifat tergantung dosis (*dose dependent*). Hewan coba mencit (*Mus musculus*) kontrol semuanya bunting, sedangkan hewan coba kelompok perlakuan yang diimunisasi dengan 10, 20, dan 40 µg berturut-turut menyebabkan kebuntingan sebesar 50, 20, dan 0 %, yang berarti terdapat peningkatan angka infertilitas 50, 80, dan 100 %, linier dengan pertambahan dosis (Mustofa dkk, 2004a).

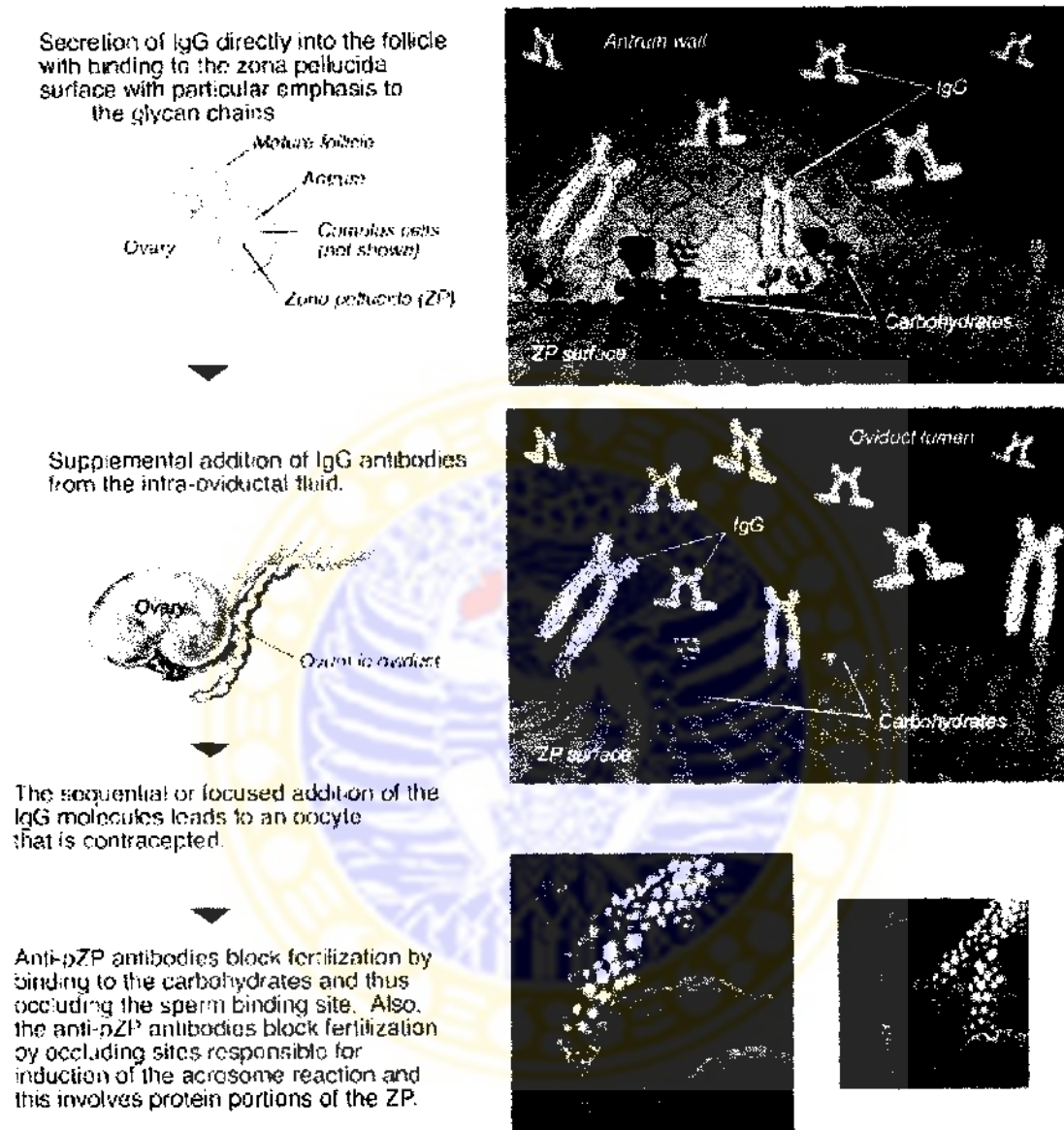
Penelitian pada mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba model, ternyata imunisasi menggunakan gZP3 bersifat reversibel. Dosis 40 µg gZP3 yang sebelumnya telah diketahui menimbulkan infertilitas 100 % menyebabkan hewan coba bisa beranak kembali setelah 91 hari. Masa kebuntingan mencit (*Mus musculus*) maksimum adalah selama 21 hari, dengan demikian terdapat masa infertil selama 70 hari. Siklus birahi mencit (*Mus musculus*) maksimum adalah lima hari, sehingga masa infertil tersebut sekitar 14 siklus birahi. Siklus birahi pada mencit (*Mus musculus*) adalah identik dengan siklus menstruasi pada wanita, dengan demikian pada wanita masa infertil tersebut setara dengan 14 siklus menstruasi (Mustofa dkk, 2004b).

Pengaruh imunisasi dengan gZP3 pada infertilitas, efek samping, dan reversibilitasnya ditentukan dari respon imun yang terjadi. Respon imun yang diharapkan adalah respon imun humoral. Infertilitas berakhir apabila antibodi yang ada sebagai produk respon imun tidak cukup adekuat untuk memblok reseptor fertilisasi pada zona pelusida.

2.1.2 Mekanisme Imunokontrasepsi

Reproduksi pada mamalia dimulai dari penyatuan sel spermatozoa dengan sel telur. Kedua gamet mengandung antigen pada permukaan selnya yang bersifat unik, *tissue specific*, dan imunogenik. Pengikatan antigen tersebut dengan antibodinya (Gambar 2.1) akan menimbulkan kegagalan fertilisasi (Bazer *et al*, 2000). Gangguan atau pengeblokan karbohidrat atau protein reseptor atau modifikasi kimiawi pada zona pelusida akan berlanjut pada efek kontrasepsi (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Perlakuan ovum dengan anti zona antibodi atau dengan enzim proteolitik tripsin dapat menyebabkan blokade perlekatan sel sperma atau pengikatannya pada zona pelusida. Pencernaan enzimatik pada *O-linked oligosaccharide* pada ZP3 akan mengubah konformasi karbohidrat spesifik yang berperan pada pengikatan zona pelusida terhadap spermatozoa (Bazer *et al*, 2000 ; Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).



Gambar 2.1 Diagram alir bekerjanya IgG pada Zona pelusida (Barber dan Fayer-Hosken, 2000).

Pada hewan yang diimunisasi dengan substansi yang berasal dari zona pelusida, level IgG dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. Imunisasi hewan coba menggunakan rekombinan zona pelusida kera Bonnet menunjukkan bahwa respon imun yang timbul

75 % adalah isotipe IgG₁, dan masing-masing 12,5 % IgG_{2A} dan IgA (Govind *et al*, 2000). Menurut Barber dan Fayrer-Hosken (2000), IgG tersebut akan terikat secara sterik pada glikoprotein ZP3 selama oosit berada dalam semua fase folikel kecuali folikel primordial. Setelah ovulasi, ikatan antara IgG dengan ZP akan dilengkapi oleh ikatan antibodi yang ada dalam oviduk. Ikatan antara IgG dengan ZP menyebabkan tidak terjadi fertilisasi.

2.2 Respon Imun

Respon imun dapat diklasifikasikan menjadi dua macam, yaitu respon imun nonspesifik dan respon imun spesifik. Respon imun nonspesifik merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang tidak dikhususkan terhadap suatu patogen tertentu, sedangkan terjadinya respon imun spesifik tergantung adanya pemaparan benda asing, pengenalan, dan kemudian reaksi penolakan tubuh secara khusus terhadapnya (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

Pada respon imun spesifik terdapat pengenalan dan pengawasan yang ketat terhadap benda asing. Respon imun spesifik merupakan reaksi hospes terhadap benda asing yang mencakup rangkaian interaksi seluler yang diekspresikan dengan penyebaran produk-produk sel yang spesifik. Respon imun spesifik mempunyai sifat spesifisitas, heterogenitas, dan memori. Spesifisitas merupakan kemampuan membedakan respon imun dengan kepekaan yang tinggi terhadap benda asing yang identik atau sama dengan

benda asing yang telah dikenali sebelumnya. Heterogenitas merupakan sifat respon imun yang mampu mengintegrasikan berbagai jenis sel dan produk untuk memberikan respon terhadap keberadaan benda asing dengan menghasilkan produk yang heterogen pula. Memori merupakan kemampuan respon imun untuk mempercepat dan memperbesar respon imun dengan cara proliferasi dan diferensiasi sel-sel yang telah disensitisasi apabila terjadi pemaparan berikutnya oleh benda asing yang sama (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

Pembentukan antibodi setelah imunisasi termasuk respon imun spesifik. Antibodi sebagai respon imun adalah gama globulin yang disebut imunoglobulin (Ig). Dikenal ada lima macam imunoglobulin, yaitu IgG, IgA, IgM, IgD dan IgE dengan waktu pemaparan, fungsi, dan afinitas terhadap jaringan yang berbeda-beda. Imunoglobulin M (IgM) dan Imunoglobulin G (IgG) merupakan respon imun terhadap antigen protein, termasuk glikoprotein zona pelusida (Barber dan Fayer-Hosken, 2000).

Imunoglobulin M merupakan molekul Ig yang paling besar ukurannya sehingga hanya terdapat intravaskuler. Imunoglobulin G adalah Ig yang paling banyak jumlahnya dalam tubuh dengan waktu paruh yang relatif cukup panjang dibandingkan isotipe Ig yang lain, yaitu 23 hari. Molekul IgG dapat mencapai konsentrasi yang tinggi baik intravaskuler maupun ekstrasvaskuler sehingga dapat bekerja pada jaringan (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

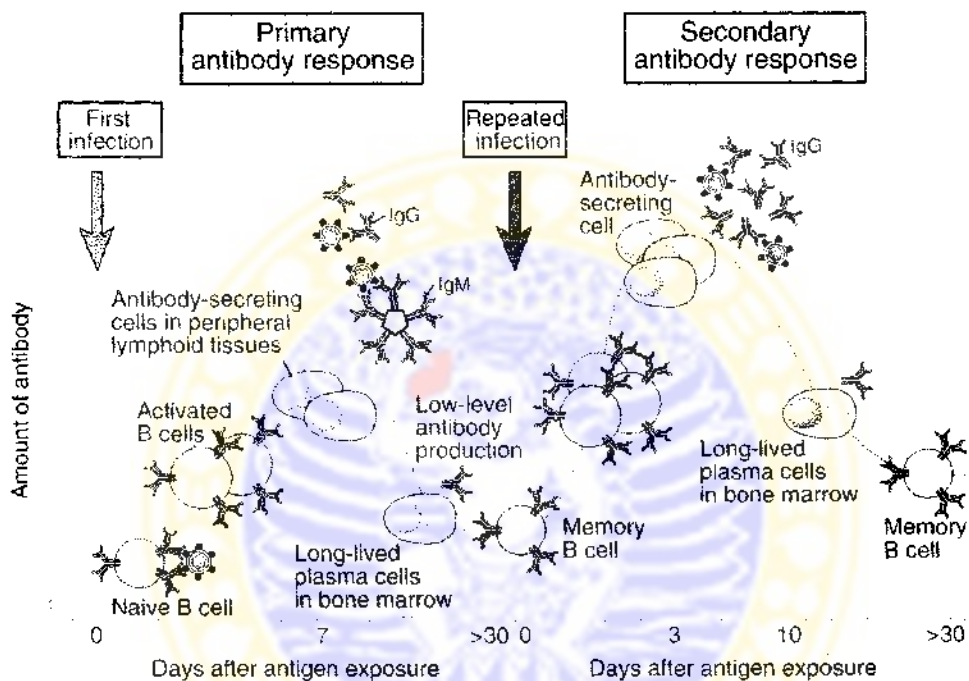
2.2.1 Berdasarkan waktu pemaparan

Pembentukan antibodi dalam individu berdasarkan waktu pemaparannya dapat dibedakan menjadi dua tahap, yaitu respon imun primer dan respon imun sekunder (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003). Titer antibodi yang terkait dengan respon imun primer dan respon imun sekunder serta sel-sel yang berhubungan dengan pembentukan antibodi dilukiskan pada Gambar 2.2.

a Respon imun primer

Penyuntikan suatu substansi asing ke dalam tubuh individu akan menghasilkan antibodi spesifik dalam darah setelah beberapa waktu, yang disebut periode induktif atau periode laten. Antibodi dapat dideteksi 5 – 7 hari sesudah penyuntikan protein yang larut air. Setelah timbulnya antibodi pertama dimulailah biosintesis aktif antibodi sehingga terjadi peningkatan konsentrasi antibodi secara logaritmik, yang mencapai titer tertinggi setelah 8 – 12 hari. Kadar antibodi setelah imunisasi adalah selisih antara angka sintesis dengan angka katabolik antibodi. Apabila kedua angka ini sama, maka kadar antibodi konstan (fase plateau). Apabila angka katabolik lebih besar daripada angka sintesis, maka respon imun memasuki fase penurunan (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003). Respon imun primer pada

umumnya ditandai oleh keberadaan imunoglobulin M (IgM) yang lebih dominan daripada imunoglobulin G (IgG) (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

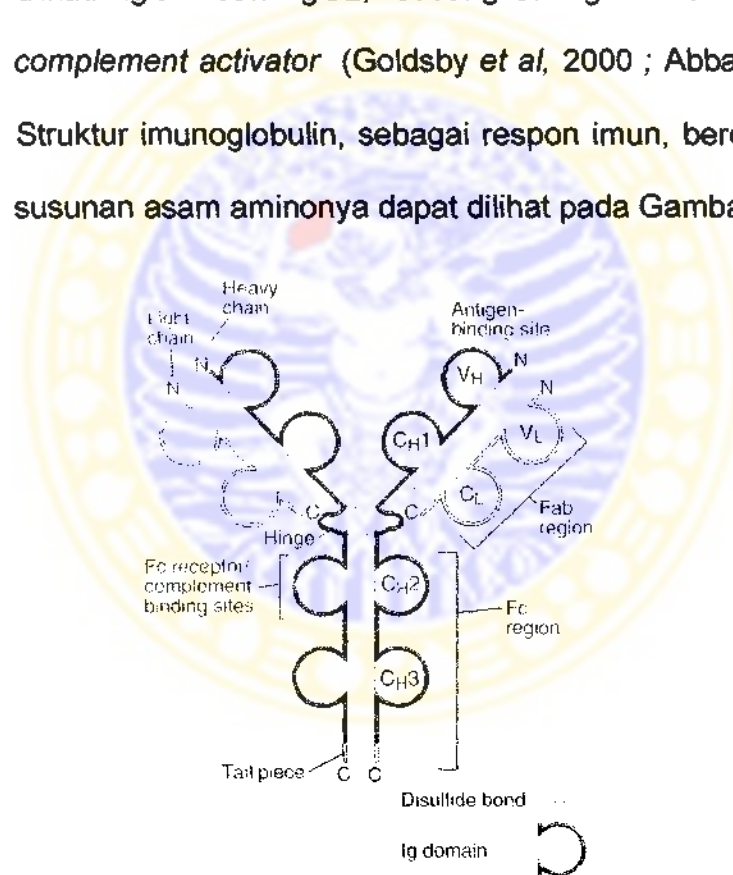


Gambar 2. 2 Respon imun primer dan sekunder (Abbas *et al*, 2003).

b Respon imun sekunder

Pemaparan kedua terhadap protein imunogen yang sama menyebabkan penambahan respon imun yang menyolok berupa munculnya sel-sel imunokompeten dan antibodi yang dipercepat. Pada respon imun sekunder periode laten lebih pendek, angka sintesis antibodi lebih cepat, puncak titer antibodi bertahan lebih lama, daya gabung antibodi lebih tinggi, lebih banyak terdapat

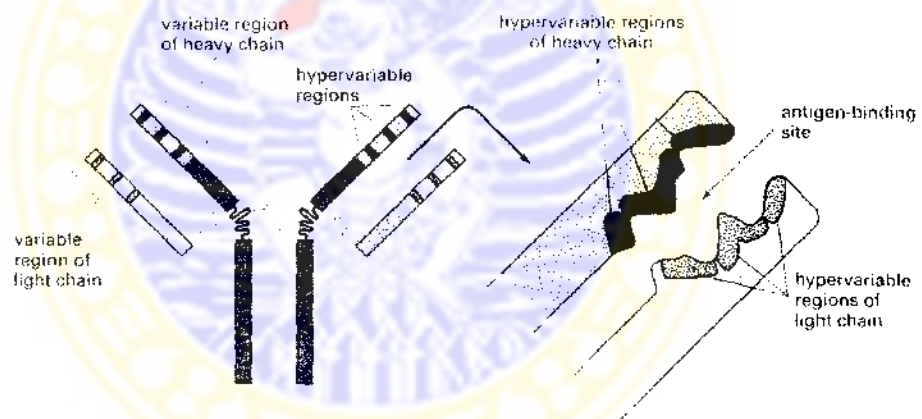
sel memori, dan immunoglobulin yang lebih banyak adalah IgG. Dengan analisis antigenik, ditemukan perbedaan-perbedaan berdasarkan substansi rangkaian asam amino dan ikatan disulfida di antara IgG, yaitu subkelas IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4. Antibodi IgG3 merupakan *complement activator* terkuat, diikuti IgG1 dan IgG2, sedangkan IgG4 bukan merupakan *complement activator* (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003). Struktur immunoglobulin, sebagai respon imun, berdasarkan studi susunan asam aminonya dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Diagram Skematis Struktur Immunoglobulin (Abbas *et al*, 2003)

Imunoglobulin G (IgG) merupakan antibodi yang dominan dalam sistem sirkulasi. Menurut Austyn dan Wood (2000) serta

Goldsby *et al* (2000), struktur dasar IgG tersusun dari sepasang *Heavy (H) chain* dan *Light (L) Chain*. Masing-masing H dan L chain terdiri dari *V (Variable) region* dan *C (Constant) region*, sehingga terdapat V_H , V_L dan C_H , C_L . Pada *V region* (V_H dan V_L), terdapat *Antigen binding sites* yang spesifik terhadap antigen tertentu (Gambar 2.4). Kerangka IgG pada *C region* (C_H dan C_L) mempunyai aktivitas biologis yang bersifat spesifik sesuai dengan spesies asal antibodi tersebut.



Gambar 2.4 Diagram Skematis Molekul Antibodi dan *Antigen Binding Site* (Alberts *et al*, 2002).

2.2.2 Berdasarkan mekanisme efektor

Ada dua jenis mekanisme efektor pada respon imun spesifik, yaitu respon imun humoral yang ditandai adanya produk antibodi dan respon imun seluler yang ditengahi oleh limfosit yang tersensitisasi

(Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003). Mekanisme respon imun humoral dan seluler dilukiskan pada Gambar 2.5.

a Respon imun humoral

Pada imunokontrasepsi, respon imun yang diharapkan adalah respon imun humoral. Respon imun humoral ditandai oleh adanya sel-sel limfosit yang berdeferensiasi dari sumsum tulang (*bone marrow*) sehingga disebut sel B. Sel limfosit B mempunyai kemampuan bereaksi dengan benda-benda asing yang merangsang pembentukan antibodi. Sel-sel B berinteraksi dengan antigen, kemudian berdeferensiasi menjadi sel-sel Blast, seterusnya menjadi sel-sel plasma yang menghasilkan antibodi (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

b Respon imun Seluler

Selain mekanisme respon imun humoral seperti tersebut di atas, antigen (Ag) eksogen dapat mengalami internalisasi untuk didegradasi oleh sel-sel dendritik sebagai *antigen presenting cells* (APC) dalam respon imun seluler. Peptida antigen membentuk kompleks dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) II yang selanjutnya dipaparkan dipermukaan APC. Sel-sel T *helper* dapat mengenali kompleks Ag-MHC II pada permukaan sel APC melalui reseptor sel T sehingga mengaktifasi sel T tersebut untuk memproduksi sitokin atau limfokin. Sitokin atau limfokin menyebabkan interaksi sel T *helper* dengan

oligosaccharide juga berperan dalam stabilisasi kompleks I_i – MHC II (Goldsby *et al*, 2000). Molekul ZP3 merupakan glikoprotein dengan ikatan O – linked *oligosaccharide* (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Gangguan fungsi ovarium akibat imunisasi dengan bahan zona pelusida tergantung beberapa faktor yaitu kemurnian antigen, suseptibilitas hewan coba, adjuvan, dan keberadaan epitop sel T pada bahan zona pelusida yang dipakai sebagai imunogen. Adanya epitop sel T pada imunogen dapat menyebabkan oophoritis. Hal tersebut dibuktikan bahwa patologi ovarium dapat diinduksi dengan transfer sel T CD4⁺ dari mencit yang diimunisasi dengan bahan ZP ke mencit resipien, tetapi tidak terjadi melalui transfer antibodi. Sel T CD4⁺ dari mencit juga dapat mengenali peptida zona pelusida mencit pada *antigen presenting cells* (APC) dalam ovarium, yang berakibat perekrutan makrofag, sekresi sitokin dan peradangan ovarium (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Respon imun spesifik dapat dipicu oleh imunisasi suatu individu dengan suatu imunogen. Dalam rangka menemukan bahan imunokontrasepsi, imunisasi aktif dapat dilakukan terhadap sperma, ovum, zigot, embrio dini (pra implantasi) maupun terhadap hormon *human chorionic gonadotropin* (hCG) (Jones, 1996 ; Kaul *et al*, 1996). Berdasarkan efisiensi tujuan pencegahan terjadinya fertilisasi, penelitian-penelitian selanjutnya diarahkan untuk menemukan imunogen yang berasal dari zona pelusida.

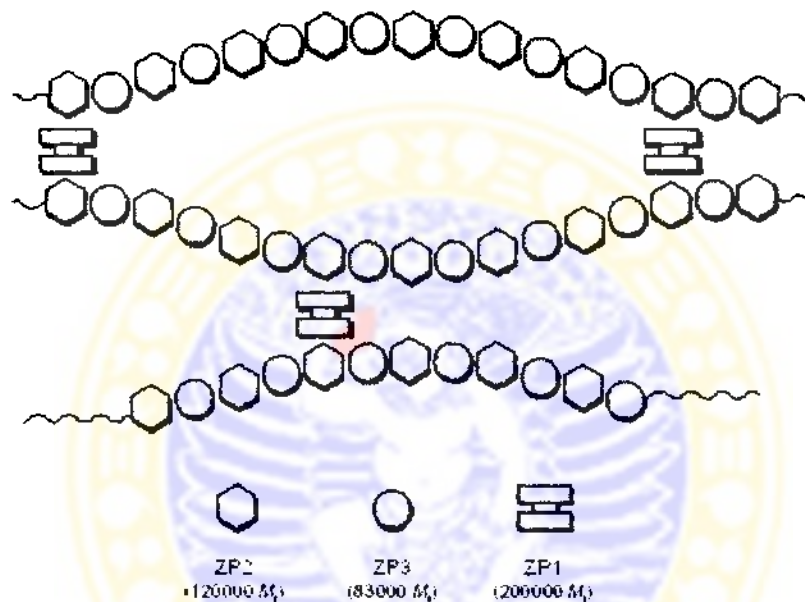
2.3 Zona Pelusida

Zona pelusida adalah suatu lapisan glikoprotein yang membungkus oosit atau sel telur. Glikoprotein zona pelusida disekresikan oleh oosit dan sel-sel granulosa pada saat folikulogenesis, dengan ketebalan 5-10 μm (Pineda, 2003 ; Hafez dan Hafez, 2000).

Zona pelusida mamalia terdiri dari dua, tiga atau empat konstituen, namun pada umumnya mengandung tiga macam konstituen protein terglykosilasi yang disebut sebagai Zp1, ZP2, dan Zp3 yang berbeda-beda massa molekul relatifnya (McCartney dan Mate, 1999 ; Wassaman *et al*, 2001). Zona pelusida (ZP) 1 mempunyai massa molekul relatif (Mr) antara 80 – 200 kDa, Mr ZP2 berkisar antara 50 – 120 kDa, dan Mr Zp3 sebesar 45 – 110 kDa (Baber dan Fayrer-Hosken, 2000). Zona pelusida mencit (*Mus musculus*), tikus (*Rattus norvegicus*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), babi (*Sus scrofa*), dan manusia (*Homo sapiens*) mengandung tiga jenis glikoprotein yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3. Zona pelusida Kera Bonnet (*Macaca radiata*) terdiri dari dua konstituen, yaitu ZP1 dan ZP3 (Rankin dan Dean, 2000). Zona pelusida sapi (*Bos indicus*) terdiri empat konstituen (Aulanni'am *et al*, 2003). Sedangkan Yonezawa *et al* (2001) dengan teknik kloning molekuler mendapatkan bahwa zona pelusida sapi (*Bos taurus*) terdiri dari tiga konstituen, yaitu ZPA (Mr = 72 kDa), ZPB (Mr = 58 kDa) dan ZPC (Mr = 45 kDa).

Glikoprotein ZP1 merupakan dimer dari dua bagian yang identik. Ketiga glikoprotein ZP menembus transmembran pada ujung C. Pada mencit rasio

antara ZP2 dengan ZP3 adalah 1 : 1, sedangkan ZP1 sekitar 9 % dari jumlah ZP2 dan ZP3. Secara anatomis ZP2 bersama ZP3 membentuk kerangka yang dihubungkan oleh ZP1 menyilang membentuk struktur tiga dimensi (Gambar 2.6) (Green, 1997).

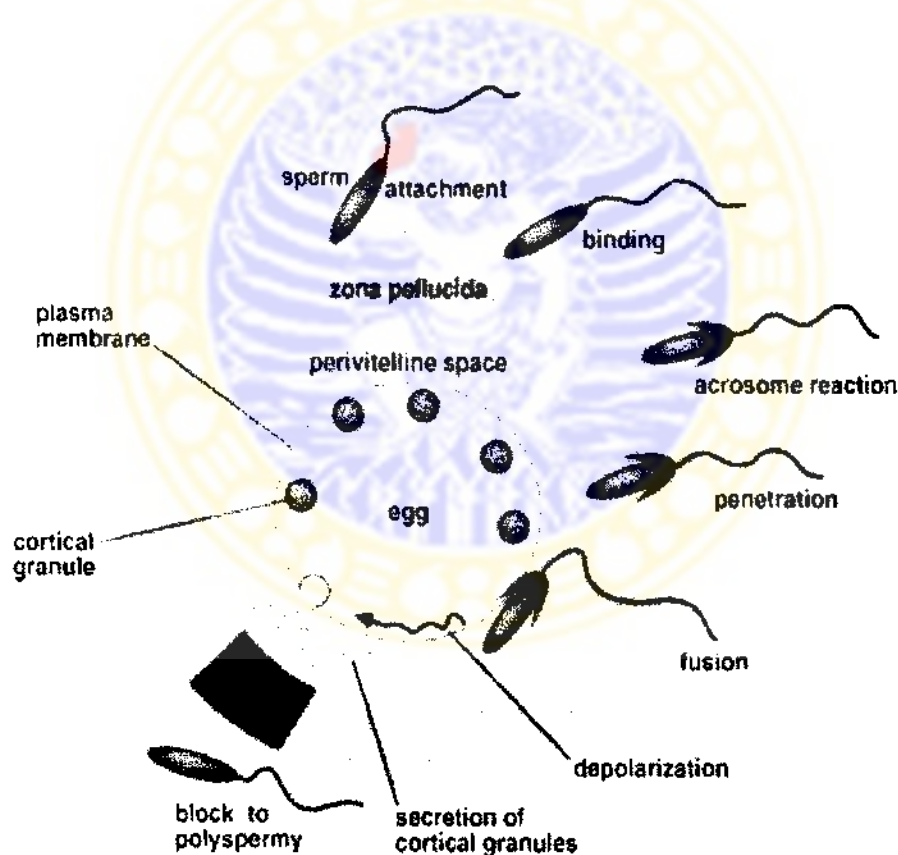


Gambar 2.6 Struktur tiga dimensi ZP1, ZP2 dan ZP3 mencit (Green, 1997).

2.3.1 Fungsi fisiologis

Zona pelusida mamalia merupakan lapisan glikoprotein ekstraseluler yang berperan penting pada interaksi antara sel spermatozoa dengan sel telur pada saat fertilisasi (Gambar 2.7). Pada sel sperma mencit (*Mus musculus*) sekurang-kurangnya terdapat empat macam protein permukaan yang berfungsi untuk berikatan dengan zona pelusida (Bradley *et al*, 1999 ; Naz, 2000 ; Wassarman, 2002). Setelah

berhasil menembus sel-sel kumulus oophorus, spermatozoa terikat pada zona pelusida, mengalami reaksi akrosom, kemudian menembus zona pelusida (Schorderet dan Huarte, 2003). Fusi kepala spermatozoa dengan vitelus sel telur menyebabkan depolarisasi membran vitelin, reaksi kortikal, dan pengerasan zona pelusida untuk mencegah polispermi. Fertilisasi diakhiri dengan singami antara pronukleus dari masing-masing gamet (Brewis dan Wong, 1999 ; Talbot *et al*, 2003).



Gambar 2.7 Tahap-tahap fertilisasi pada mamalia (Takasaki *et al*, 1999).

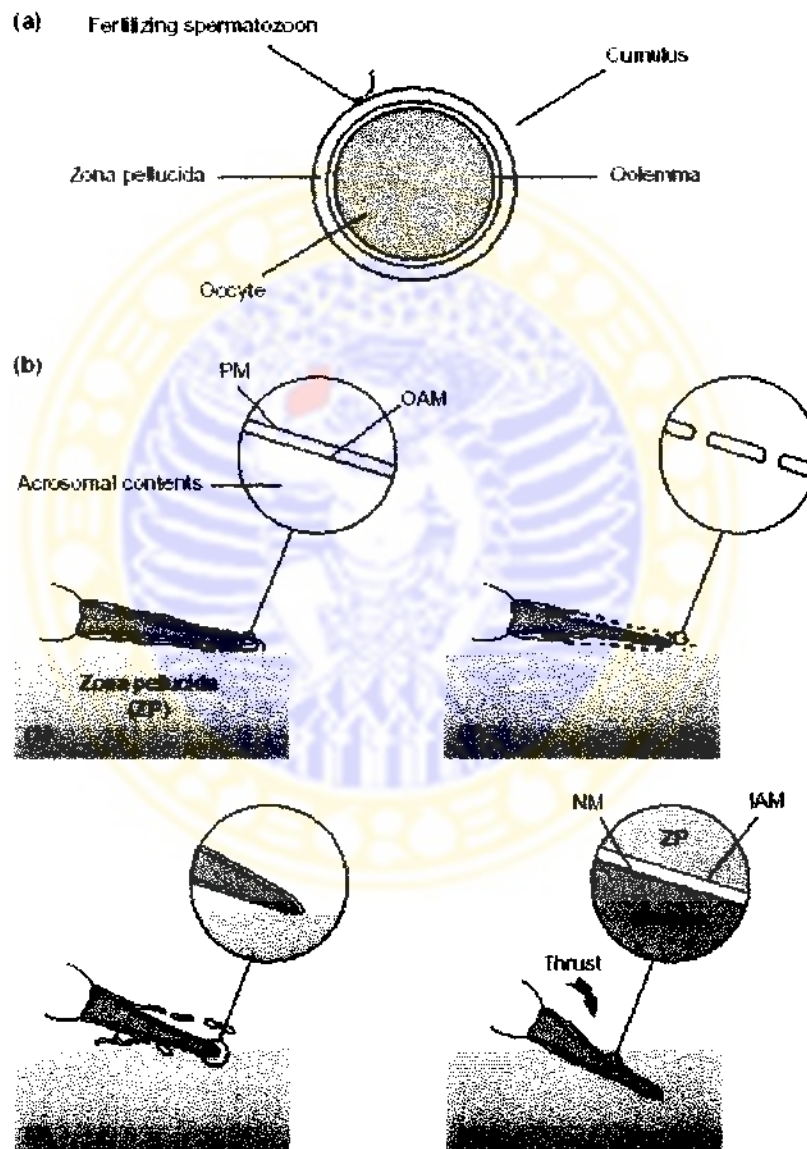
Di antara komponen-komponen glikoprotein pada zona pelusida tersebut, ZP3 yang berperan penting dalam proses fertilisasi. Fungsi ZP3

adalah sebagai reseptor primer untuk reaksi pengenalan spermatozoa yang berlanjut dengan terikatnya spermatozoa pada zona pelusida. Spermatozoa terikat pada reseptor ZP3 melalui ikatan serin - threonin *O-linked oligosaccharide*. Keberadaan *glycosyl transferase* pada membran plasma spermatozoa menyebabkan kepala spermatozoa dapat menghasilkan ikatan kepada ZP3 melalui mekanisme sebagaimana hubungan antara enzim dengan substratnya atau antara lubang kunci dengan anak kuncinya (Bazer *et al*, 2000).

Karbohidrat pada glikoprotein zona pelusida berperan penting dalam interaksi awal sel telur dengan spermatozoa, yaitu sebagai barrier spesies, kapasitas, dan viabilitas spermatozoa serta mencegah polispermi. Ikatan karbohidrat – protein yang membentuk glikoprotein pada zona pelusida adalah *O – linked* (Baber dan Fayrer-Hosken, 2000).

Pada membran plasma spermatozoa mencit (*Mus musculus*) terdapat $\beta 1,4$ – *galactosyltransferase* (Galtase) yang berperan sebagai protein pengikat sel telur pada ZP3. Ikatan primer antara sel spermatozoa dengan ZP3 mengawali reaksi akrosom. Setelah spermatozoa terikat pada ZP3, sel spermatozoa mengalami reaksi akrosom, yaitu membran plasma dan membran luar akrosom akan mengadakan fusi pada beberapa bagian sehingga menyebabkan vesikulasi membran yang berlanjut dengan dikeluarkannya isi akrosom. Peristiwa tersebut mengakibatkan membran luar akrosom (*outer acrosomal membrane*,

OAM) terbuka sehingga ligan yang terdapat pada membran akrosom bagian dalam dapat mengadakan kontak dan berikatan dengan reseptor ZP2 pada zona pelusida sel telur (Gambar 2.8) (Brewis dan Wong, 1999).



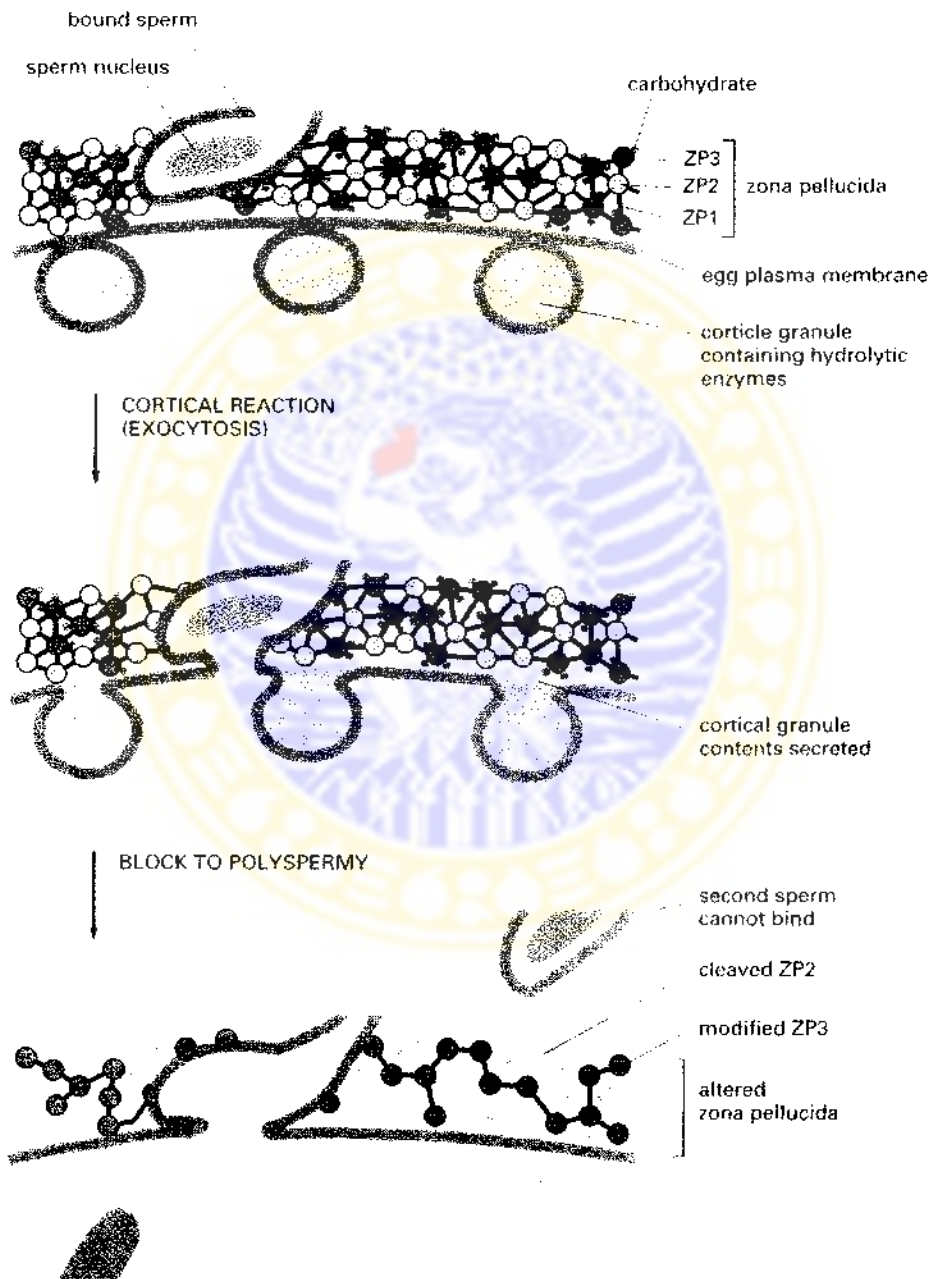
Gambar 2.8 Diagram skematis interaksi awal gamet mamalia PM : *plasma membrane*, OAM : *outer acrosomal membrane*, NM : *nuclear membrane*, IAM : *inner acrosomal membrane* (Brewis dan Wong, 1999).

Glikoprotein ZP2 berperan sebagai reseptor spermatozoa kedua, yang berperan untuk menjaga tetap terikatnya spermatozoa selama proses menembus zona pelusida (Brewis dan Wong, 1999). Penetrasi zona pelusida oleh sel spermatozoa terjadi 5-15 menit setelah $\beta 1,4$ – *galactosyltransferase* (Galtase), sebagai ligan pada sel spermatozoa menempelkan diri pada glikan Gal- β (1,3)-GalNAc, reseptor pada ZP3 (Bazer *et al*, 2000).

Setelah fertilisasi, permukaan ovum berubah untuk mencegah adanya fusi dengan sel sperma yang lain. Pencegahan polispermi ini diperankan oleh zona pelusida dan dengan blokade fisiologis kedua pada membran vitelin. Inisiasi blokade terhadap polispermi berlangsung pada saat terjadinya penetrasi spermatozoa pada ovum, yaitu ketika dilepaskannya granula kortikal ke dalam ruang peri vitelin (Bazer *et al*, 2000 ; Brewis dan Wong, 1999).

Massa material yang dilepaskan granula kortikal sekitar 30 % massa ZP1, yang secara dominan terdistribusikan pada lapisan dalam zona pelusida. Pengelepasan isi granula tersebut, disebut sebagai reaksi kortikal, menghasilkan reorganisasi ekstensif pada zona pelusida dan permukaan vitelin. Reaksi kortikal menghasilkan pelepasan enzim-enzim yang menyebabkan pengerasan zona pelusida dan inaktivasi reseptor zona pelusida, khususnya ZP3 (Gambar 2.9). Hal ini terjadi melalui pelepasan enzim heksosamidase yang memecah *O* – *linked*

oligosaccharides sehingga spermatozoa lain tidak dapat lagi terikat pada zona pelusida (Miller *et al*, 2000).



Gambar 2.9 Diagram Skematis Reaksi Kortikal pada Zona Pelusida untuk Mencegah Polispermi (Alberts *et al*, 2002).

2.3.2 Asam amino ZP3

Zona pelusida mengandung antigenik determinan berupa glikoprotein yang bervariasi, namun terdapat homologi urutan asam amino diantaranya. Spesifisitas interaksi antara spermatozoa dan ZP3 tergantung pada *backbone* polipeptida. Terdapat *high species-specific divergence* pada *sequence* asam amino ZP3 pada regio yang berperan dalam ikatan tersebut (Zhu dan Naz, 1999). Selanjutnya Zhu dan Naz (1999) melaporkan terdapat homologi susunan asam amino ZP3 pada 13 spesies vertebrata, yaitu tikus, hamster, kelinci, babi, babi hutan, sapi, anjing, kucing, manusia, bonnet, marmoset, ikan, dan katak. Data persentase homologi beberapa spesies dikutip sebagaimana Tabel 2.1.

Pada susunan asam amino ZP3 beberapa mamalia terdapat tiga regio, yaitu (1) *leader sequence* yang terdiri dari 20-25 asam amino (berada pada posisi antara 1-129), (2) *central region* (posisi antara 130-401), dan (3) *C terminal region* (pada posisi antara 402-518) (Zhu dan Naz, 1999). Pada ZP3 terdapat suatu *sequence* asam amino tertentu yang berperan sebagai struktur antigen spesies-spesifik (Hasegawa *et al*, 2002), khususnya variasi N- dan C- terminal yang ada pada *central region* (Zhu dan Naz, 1999).

Diantara beberapa spesies yang diteliti Zhu dan Naz (1999), diketahui terdapat enam *conserve sequence* relatif pada *central region*, (1) : 22 asam amino (pada posisi 129-151 : VTVSKDLFGTGKLIRP), (2)

: 54 asam amino (posisi 189-242 : LVYSTFLLHDPRPGNLSILRTNRAEV
PIECRYPR QGVSSQAILPTWVPFRTT), (3) : 24 asam amino (posisi
275-298 : AHLQAEVHTGSHVPLRLFVDHCVA), (4) : 16 asam amino
(posisi 309-324 : SPYHTIVDFHGCLVDG), (5) : 28 asam amino (posisi
331-358 : SAFKAPRPRPDTLQFTVDVVFANDSRN), dan (6) : 24 asam
amino (posisi 378-401 : LNKACSFSSNSWFPVEGPADIC).

Tabel 2.1. Persentase Homologi Asam Amino Penyusun Zona Pelusida 3 (ZP3) pada Beberapa Spesies Mamalia (Zhu dan Naz, 1999).

	Hamster	Kelinci	Babi	Sapi	Anjing	Kucing	Manusia	Bonnet	Marmoset
Tikus	83,9	69,2	67,5	69,1	70,9	71,6	68,0	71,8	70,9
Hamster		69,5	67,9	68,2	70,7	68,5	72,7	72,0	71,1
Kelinci			95,4	70,4	70,8	68,9	72,6	72,1	72,4
Babi				84,4	69,6	68,4	71,5	71,3	70,6
Sapi					77,4	77,1	75,1	74,2	74,4
Anjing						83,5	76,2	75,7	73,8
Kucing							74,5	74,8	72,1
Manusia								95,5	91,7
Bonnet									90,3

Berdasarkan data tersebut, kemiripan susunan asam amino (homologi) tertinggi terdapat pada spesies hewan yang sama ordo pada klas yang sama. Homologi antara tikus dan hamster (*rodenta*) adalah sebesar 83,9 % ; antara anjing dan kucing (*camivora*) sebesar 83,5 % ; antara babi dan sapi (*ungulata*) sebesar 84,4 % ; dan antara manusia dan kera (*primata*) sebesar 95,5 % (Zhu dan Naz, 1999). Adanya homologi

susunan asam amino ZP3 mamalia tersebut menyebabkan terjadinya reaksi silang antigen antibodi pada Elisa. Hasegawa *et al* (2002) melaporkan bahwa antiserum terhadap peptida babi, kelinci dan manusia dapat bereaksi silang terhadap peptida yang lain dengan derajat yang berbeda-beda. Terdapatnya homologi susunan asam amino ZP3 diantara beberapa spesies pada mamalia, yang antara lain ditandai oleh reaksi silang antigen – antibodi, memungkinkan dilakukannya imunisasi pada hewan coba yang heterolog atau pada manusia untuk menginduksi infertilitas (Srivastava *et al*, 2002).

Susunan asam amino ZP3 beberapa spesies pada mamalia dapat diakses dari situs NCBI di internet, namun sampai saat ini susunan asam amino ZP3 kambing belum ada publikasinya. Berdasarkan data yang ada di situs internet tersebut dikutipkan susunan asam amino protein ZP3 tiga spesies, yaitu mencit (*Mus musculus*), manusia (*Homo sapiens*), dan sapi (*Bos taurus*) (selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 10). Susunan asam amino ketiga spesies tersebut dicantumkan berdasarkan pertimbangan bahwa mencit (*Mus musculus*) dipakai sebagai hewan coba model pada penelitian ini, manusia (*Homo sapiens*) sebagai target imunokontrasepsi di masa depan, dan sapi (*Bos taurus*), spesies yang memiliki kekerabatan terdekat dengan kambing (*Capra hircus*), yang diteliti potensi ZP3-nya pada penelitian ini. Data susunan asam amino ketiga spesies tersebut adalah sebagai berikut.

Mus musculus :

```
/translation="MASSYFLFLCLLLCGGPELCNSQTLWLLPGGTPTVPGSSSPVKV
ECLEAELVTVSRDLFGTGKLVQPGDLTLGSEGCQPRVSVDTDWVRFNAQLHECSSRV
QMTKDALVYSTFLLHDP RPVSGLSILRTNRVEVPIECRYPRQGNVSSHPIQPTWVPR
ATVSSEEKLAFLSLRRLMEENWNTEKSAPTFHLGEVAHLQAEVQTGSHLPLQLFVDHCVA
TPSPLPDPNSSPYHFIVDFHGCLVDGLSESFSAFQVPRPRPETLQFTVDVHFANSSR
NTLYITCHLKVAPANQIPDKLNKACSFNKT SQSWLPVEGDADICCCSHGNCSNSSSS
QFQIHGPRQWSKLVSRNRRHVTEADVTVGPLIFLGKANDQTVEGWTASAQTSVALGL
GLATVAFLTAAIVLAVTRKCHSSSYLVSLPQ" (Boja et al, 2003)
```

Homo sapiens :

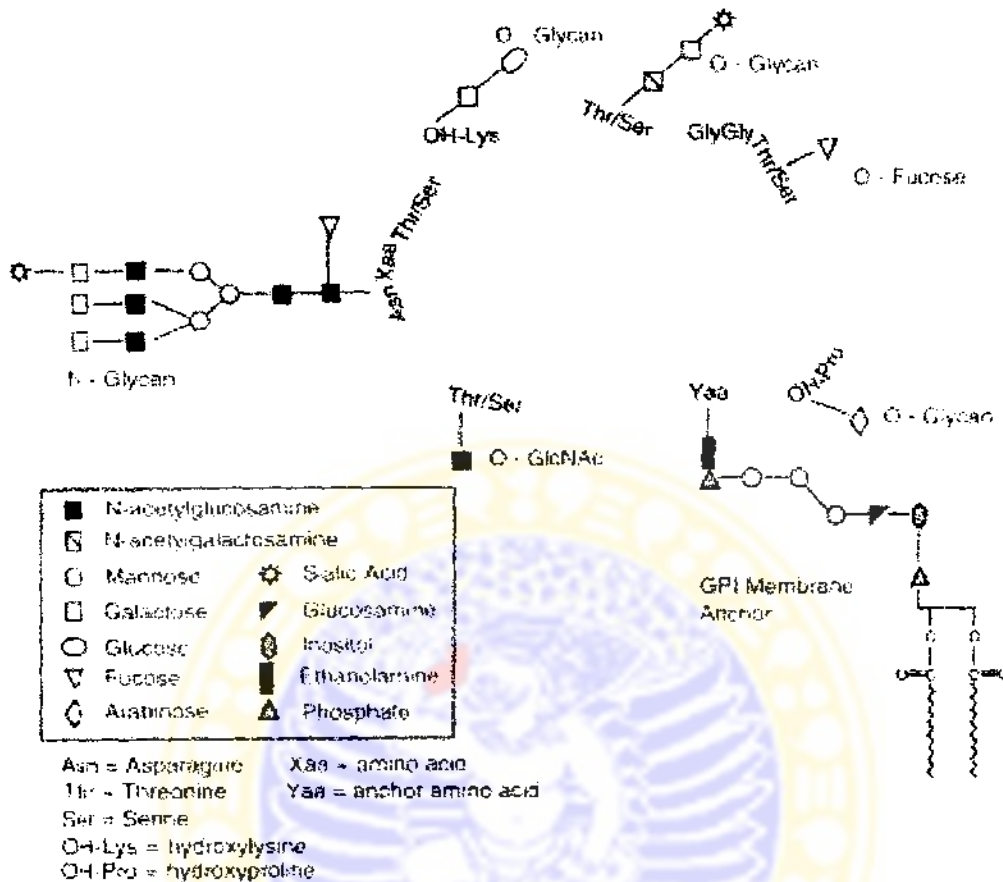
```
/translation="MELSYRLFICLLWGSTELCYPQPLWLLQGGASHPETSVQPVLV
ECQEATLMVMVSKDLFGTGKLRADLT LGPEACEPLVSMDEVDVRFVGLHECGNS
MQVTDDALVYSTFLLHDP RPVGNLSIVRTNRAEIPICRYPRQGNVSSQAILPTWLPF
RTTVFSEEKLT FSLRRLMEENWNAEKRSPTFHLGDA AHLQAEIHTGSHVPLRFLVDHCV
ATPTPDQNASPYHTIVDFHGCLVDGLT DASSAFKVPRPGPDTLQFTVDVHFANDSRN
MIYITCHLKVTLAEQDPDELNKACSF SKPSNSWFPVEGPADICCCNKGDCGTPSHSR
RQPHVMSQWSRSASRNRRHVTEEADVTVGPLIFLDRRGDHEVEQWALPSDTSVLLGV
GLAVVSLTLTAVILVLRRCRTASHPVSASE" (Wassarman, 2002)
```

Bos taurus :

```
/translation="MGPCSRLFVCFLLWGSTELCSPQPFWDDETERFRPSKPPAVMVE
CQEAQLVTVDKDLFGTGKLRPADLT LGPDNCEPLASADTDGWRFVAVGLHECGNIL
QVTDNALVYSTFLLHNPRPAGNLSILRTNRAEVPIECHYPRQGNVSSWAIQPTWVPR
TTVFSEEKLVFSLRRLMEENWSAEKMTPTFQLGDR AHLQAQVHTGSHVPLRFLVDHCVA
SLTPDWSTSPYHTIVDFHGCLVDGLT DASSAFKAPRPRPEILQFTVDVFRFANDSRNM
IYITCHLKVTPVDRVPDQLNKACSF SKSSNRWSPVEGPTDICRCCSKGRCGISGRSMR
LSHREGRPVPRSRRHVTEEADVTVGPLIFL RKMNDRGVEGPTSSPPLVMLGLLATVM
TLTAAIVLGLTGRLRAASHPVCPVSASQ" (Harris et al, 1994)
```

2.3.3 O-Linked Oligosakarida pada ZP3

Ikatan spermatozoa pada ZP adalah suatu tahap yang dimediasi karbohidrat. Spesifisitas interaksi antara spermatozoa dan ZP3 juga tergantung pada glikosilasi residu asam amino pada *backbone* polipeptida sebagai *O-linked* (Gambar 2.10).



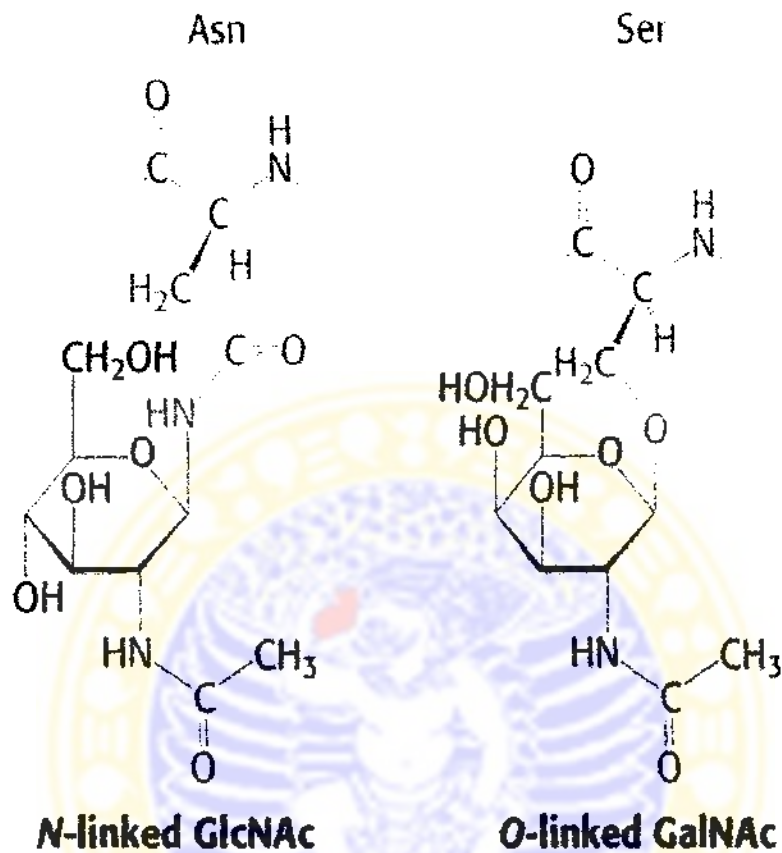
Gambar 2.10 Komposisi *O-linked* dan *N-linked* Oligosakarida (Van den Steen *et al*, 1998).

Pada pencit ujung karboksil mZP3 adalah penting untuk terikatnya spermatozoa. Regio ini dikode oleh ekson gen nomor 7 dan terdiri dari lima asam amino serine (Ser-329, -331, -332, -333, -334) sebagai posisi yang potensial untuk terikatnya *O-linked* (Gambar 2.11). Motif ikatan glikosilasi *O-linked* pada lima asam amino serin adalah satu asam amino serin dipisahkan oleh satu asam amino lain dari empat asam amino serin yang lain. Urutan asam amino Ser – asam amino X – Ser-Ser-Ser-Ser,

merupakan sinyal *species-specific* terikatnya *O-linked* oligosakarida pada mencit. Pada murine residu serine berada pada posisi 331 – 335 (Zhu dan Naz, 1999). Pada kedudukan *O-linked* tersebut tidak dijumpai asam amino prolin, tetapi pada umumnya terdapat sembilan asam amino (empat diantaranya adalah sistein) membentuk konformasi ikatan *O-linked* oligosakarida (Van den Steen *et al*, 1998 ; Zara *et al*, 1998).

Glikosilasi *O-linked* sangat penting pada tahap pengenalan antara oosit dan spermatozoa pada fertilisasi. Ikatan antara spermatozoa dengan oosit yang bersifat *species specific* terutama ditentukan oleh struktur rantai oligosakarida pada ZP3. Glikosilasi *O-linked* dengan ujung β -GalNAc atau ujung β -GlcNAc menengahi ikatan dengan spermatozoa, namun yang lebih sering adalah ujung β -GalNAc (Gambar 2.11). Oligosakarida sintesis dengan terminal Gal menghambat ikatan spermatozoa pada oosit, sedangkan oligosakarida dengan terminal GlcNAc tidak efektif (Van den Steen *et al*, 1998).

Rantai *O-linked* oligosakarida pada ZP3 berperan sebagai *binding epitope* pada spermatozoa. Diketahui terdapat empat macam monosakarida yang berperan penting pada pengenalan spermatozoa, yaitu α -galactose, β -*N*-acetylglucosamine (GlcNAc), fucose, dan mannose (Talbot *et al*, 2003). Perubahan struktur oligosakarida berakibat perubahan kemampuan ikatan spermatozoa dengan sel telur yang bersifat *species-specific*.



Gambar 2.11 Struktur molekul *O-linked N-acetylgalactosamine* dan *N-linked N-acetylglucosamine* (Zara et al, 1998).

Suatu penelitian dilakukan pada tikus untuk membawa gen *human sperm-receptor (hZP3)* sebagai hewan transgenik. Oosit dari tikus betina homosigot *mZP3^{-/-}* tidak memiliki ZP dan infertil, sedangkan oosit mencit *mZP3^{-/-}* yang membawa gen *hZP3* memiliki ZP yang tebal, terdiri dari *mZP1*, *mZP2*, dan *hZP3*. Namun, *human sperm* ternyata gagal berikatan dengan ZP oosit tikus transgenik tersebut, sedangkan spermatozoa tikus

dapat terikat dan betina tersebut fertil. Hal ini disebabkan *O-linked* oligosakarida pada hZP3 hewan transgenik tersebut lebih bersifat '*mouse-like*', daripada '*human-like*', karena konstituen hZP3 pada oosit tikus tersebut disintesis oleh oosit tikus (Wassarman *et al*, 2001).

Pentingnya glikosilasi tersebut adalah sebagai *species barrier* dan mencegah polyspermia dengan mengaktifkan *signal transduction*. Glikosilasi bukan hanya berperan pada fertilisasi oosit oleh spermatozoa tetapi juga penting untuk terjadinya kapasitas dan viabilitas spermatozoa.

2.3.4 Uji reseptor pada zona pelusida

Dalam penelitian-penelitian untuk menemukan protein gamet sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi, perhatian diarahkan pada reseptor fertilisasi yang ada pada zona pelusida. Pengujian reseptor fertilisasi tersebut dimaksudkan untuk mengidentifikasi keberadaan protein, mengidentifikasi fungsi atau untuk menguji potensi imunokontrasepsinya.

a Uji Imunofluoresen

Uji *indirect immunofluorescence* dapat dipakai untuk mengidentifikasi keberadaan reseptor fertilisasi pada zona pelusida. Uji tersebut berdasarkan prinsip reaksi antigen (reseptor fertilisasi pada zona pelusida) dengan antibodi spesifiknya. Visualisasi terhadap reaksi tersebut dilakukan

dengan menggunakan antibodi sekunder, yaitu antibodi terhadap antibodi spesifik tersebut yang terlabel dengan *fluoro iso thio cyanate* (FITC). Pengujian keberadaan reseptor fertilisasi, bahan yang digunakan dapat berupa bahan histologis ovarium (Govind *et al*, 2000 ; Srivastava *et al*, 2002) ; oosit (Hasegawa *et al*, 2002 ; Hemachand *et al*, 2002) ; embrio (Hemachand *et al*, 2002) atau spermatozoa (Hemachand *et al*, 2002 ; Carmona *et al*, 2002).

Keberadaan *egg binding protein* pada spermatozoa dapat diidentifikasi dengan cara yang sama, yaitu menggunakan antibodi terhadap spermatozoa (Carmona *et al*, 2002). Oleh karena itu, dalam perkembangannya uji tersebut dapat juga dilakukan untuk mengetahui hubungan reseptor fertilisasi pada zona pelusida dengan ligannya, yaitu *egg binding protein* pada permukaan membran plasma spermatozoa. Hemachand *et al* (2002) melakukan pengujian keberadaan *egg binding protein* pada permukaan membran spermatozoa dengan mereaksikan preparat ulas spermatozoa dengan ZP3 (reaksi reseptor – ligan) selanjutnya direaksikan dengan antibodi zona pelusida dan divisualisasikan dengan antibodi sekunder terlabel FITC.

b Fertilisasi *in vitro* (Fiv)

Teknologi fertilisasi *in vitro* dapat digunakan untuk mengidentifikasi fungsi reseptor gamet pada peristiwa fertilisasi

Teknologi fertilisasi *in vitro* terdiri dari beberapa tahap, yaitu maturasi oosit, preparasi sperma, dan inseminasi *in vitro* (Mahaputra dan Mustofa, 2000). Pengujian reseptor fertilisasi dengan teknik fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan perlakuan pada oosit (Rankin *et al*, 2001 ; Hasegawa *et al*, 2002), atau pada spermatozoa (Naz dan Zhu, 1998 ; Ramalho-Santos *et al*, 2000).

Maturasi oosit merupakan satu tahap penting dalam rangkaian fertilisasi *in vitro*. Keberhasilan maturasi oosit *in vitro* sangat menentukan keberhasilan fertilisasi *in vitro*. Hanya oosit yang matang yang akan berhasil dibuahi oleh sel spermatozoa (Mahaputra dan Mustofa, 2000).

Pengumpulan oosit kambing atau sapi dapat dilakukan dengan aspirasi folikel berpenampang 1 - 5 mm pada ovarium dengan menggunakan jarum 18G yang dihubungkan dengan alat suntik yang berisi cairan pencuci oosit (*Oosit Washing Solution*, OWS). Oosit yang didapat masih memerlukan proses pematangan untuk mencapai stadium metafase II (memiliki *pronucleus* dan *polar body I*). Pertumbuhan *in vitro* tersebut membutuhkan media dengan suplementasi hormon gonadotropin dan steroid (Hafez dan Hafez, 2000), agar kondisi lingkungannya sesuai dengan kondisi fisiologis yang terjadi *in vivo*. Oosit yang telah matang yaitu pada tingkat metafase II, sama dengan oosit

yang baru mengalami ovulasi sehingga siap bersingami dengan sel spermatozoa. Suplementasi serum sapi birahi dapat dilakukan untuk meningkatkan hasil proses pematangan oosit, sehingga perkembangan embrio lebih baik setelah oosit matang tersebut diinseminasi *in vitro* (Mahaputra dkk, 1998 ; Mustofa dkk, 1999 ; Restiadi, 2001).

Pada fertilisasi *in vitro* mencit (*Mus musculus*), oosit matang diperoleh secara *in vivo* dengan cara melakukan superovulasi pada mencit betina. Superovulasi dilakukan dengan penyuntikan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) 5 iu subkutan. Penyuntikan *human chorionic gonadotropin* (hCG) 5 iu subkutan dilakukan 48 jam kemudian, selanjutnya hewan coba dikumpulkan dengan pejantan yang telah divasektomi untuk merangsang ovulasi. Oosit dikoleksi dari kantung oosit pada oviduk 17 jam setelah penyuntikan hCG (Rankin *et al*, 2001).

Preparasi spermatozoa dilakukan untuk mendapatkan sel spermatozoa dengan motilitas tinggi sehingga mempunyai kemampuan membuahi (Mahaputra dan Mustofa, 2000). Sebagai persiapan untuk inseminasi, semen beku terlebih dahulu dicairkan kembali di dalam air hangat 37°C selama satu menit untuk kemudian dicuci dengan pencuci semen (*Semen Washing Solution*, SWS). Setelah pencucian, sel spermatozoa dilakukan

kapasitas dalam medium fertilisasi selama 1 - 3 jam, baru diambil 5 - 20 μ l (tergantung konsentrasi sel spermatozoa motil) dengan mikropipet untuk dimasukkan dalam tetes medium fertilisasi (Mahaputra dan Mustofa, 1999 ; Restiadi, 2001). Selain dengan medium di atas, kapasitas dan fertilisasi sel spermatozoa dapat pula dilakukan dengan memakai larutan EBSS (Mahaputra dan Mustofa, 1999).

Pada fertilisasi *in vitro* mencit (*Mus musculus*) spermatozoa motil diperoleh dengan cara pembilasan kauda epididimis mencit pejantan fertil yang telah dikurbankan. Konsentrasi sperma dibuat menjadi 2×10^6 sel / ml dalam tetes 50 μ l M16. Kapasitas dilakukan pada inkubator 5 % CO₂, suhu 35 ° C selama satu jam (Rankin *et al*, 2001).

Beberapa teknik dapat dilakukan untuk proses inseminasi *in vitro* atau fertilisasi *in vitro*. Ada yang memasukkan oosit ke dalam media fertilisasi yang sudah berisi sel spermatozoa, ada pula yang menempatkan oosit dalam media fertilisasi, baru dimasuki sel spermatozoa dengan konsentrasi yang telah dihitung (Mahaputra dan Mustofa, 2000 ; Restiadi, 2001). Pada mencit, Rankin *et al* (2001) memasukkan oosit sebanyak 15 – 20 buah ke dalam tetes spermatozoa, ditutup minyak parafin kemudian diinkubasi pada inkubator 5 % CO₂, suhu 37 ° C untuk

fertilisasi. Embrio fase dua sel diperoleh pada oosit yang mengalami fertilisasi empat jam kemudian.

c *Binding assay*

Binding assay merupakan *bioassay* fungsi ikatan spermatozoa dengan zona pelusida khususnya komponen glikoprotein zona pelusida sebagai *sperm binding protein* terhadap *egg binding protein* pada membran plasma spermatozoa (Franken *et al*, 1991). Pada membran plasma spermatozoa terdapat β 1,4-galactosyltransferase yang dapat berikatan dengan glikoprotein zona pelusida-3 (Miller *et al*, 2002).

Binding assay merupakan tolok ukur untuk menguji kemampuan ikatan spermatozoa pada zona pelusida (WHO, 1992) sehingga dapat dipakai untuk memprediksi keberhasilan fertilisasi *in vitro* dan untuk melengkapi informasi klinis faktor suami (Franken *et al*, 1993), khususnya defek pada ikatan terhadap zona pelusida dan defek penetrasi (Oehninger *et al*, 1991). *Hemizona assay* dapat pula digunakan untuk menguji spesifisitas interaksi antara spermatozoa dengan zona pelusida interspesies (Oehninger *et al*, 1993) dan menguji antifertilitas pada pengembangan teknologi kontrasepsi (Franken *et al*, 1993).

Ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida bersifat spesifik dan irreversible (Franken *et al*, 1991). Uji spesifisitas interspesies menunjukkan terdapat *high species specificity* dalam ikatan spermatozoa – oosit dan reaksi akrosom. Spermatozoa dan zona pelusida homolog menghasilkan angka ikatan dan reaksi akrosom yang sangat tinggi, sedangkan pada spesies yang heterolog angka ikatan dan reaksi akrosom sangat rendah. Hemi zona manusia dapat mengikat $93,2 \pm 15,8$ spermatozoa manusia, namun hanya dapat mengikat $3,9 \pm 1,3$ spermatozoa Makaka. Sebaliknya hemi zona Makaka dapat mengikat $126 \pm 34,8$ spermatozoa Makaka, tetapi hanya dapat mengikat $2,8 \pm 1,6$ spermatozoa manusia (Oehninger *et al*, 1993).

Oosit untuk *Binding assay* dapat menggunakan oosit *immature* (stadium profase I), *pre ovulatory oocyte* (metafase II) maupun sisa oosit fertilisasi *in vitro*, yaitu oosit yang gagal fertilisasi. Oosit yang telah dibuahi namun gagal berkembang tidak dapat dipakai untuk *Binding assay* (Oehninger *et al*, 1991). Sebagai kontrol internal oosit dibelah menjadi dua, separuh untuk uji kapasitas ikatan spermatozoa pasien dan separuh yang lain untuk spermatozoa kontrol (Oehninger *et al*, 1993) atau oosit dari individu yang sama, sebagian untuk kontrol, sebagian yang lain untuk perlakuan.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Zona pelusida kambing (*goat zona pellucida*, gZP) adalah lapisan ekstraseluler pada oosit kambing yang terdiri dari beberapa konstituen. Zona pelusida mamalia pada umumnya mengandung tiga macam glikoprotein yang disebut Zp1, ZP2, dan Zp3 (Wassarman *et al*, 2001). Di antara komponen-komponen glikoprotein tersebut, ZP3 berperan penting dalam fertilisasi karena berfungsi sebagai reseptor primer pengenalan spermatozoa. Oleh karena itu, ZP3 merupakan antigen yang potensial untuk target imunokontrasepsi (McCartney dan Mate, 1999 ; Sumitro dan Aulanni'am, 2001). Glikoprotein gZP3 merupakan reseptor fertilisasi (*sperm receptor*) yang dapat dikenali oleh ligan (*egg binding protein*) pada membran plasma spermatozoa.

Zona pelusida mengandung antigenik determinan yang bervariasi pada mamalia (Skinner *et al*, 1999), namun terdapat homologi susunan asam aminonya. Secara struktural terdapat tiga regio susunan asam amino ZP3, yaitu *leader sequence*, *central region*, dan *C terminal region* (Zhu dan Naz, 1999). Suatu *sequence* asam amino tertentu pada ZP3 berperan sebagai struktur antigen *species specific* (Hasegawa *et al*, 2002), yaitu variasi N- dan C- terminal pada *central region* (Zhu dan Naz, 1999 ; Miller *et al*, 2002). Adanya homologi susunan asam amino ZP3 pada beberapa spesies menyebabkan terjadinya

reaksi silang antigen-antibodi pada Elisa (Hasegawa *et al*, 2002). Elisa *indirect* serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol yang pernah beranak dan serum wanita (*Homo sapiens*) kontrol yang pernah mempunyai anak, menunjukkan bahwa keduanya dapat dikenali oleh protein gZP3 (Mustofa dkk, 2004b). Menurut Srivastava *et al* (2002), adanya reaksi silang tersebut memungkinkan dilakukannya imunisasi heterolog untuk menginduksi infertilitas.

Ikatan spermatozoa pada zona pelusida adalah suatu tahap yang dimediasi karbohidrat. Interaksi antara spermatozoa dan ZP3 yang bersifat *species specific* ditentukan oleh glikosilasi residu asam amino pada *backbone* polipeptida, yaitu serine *O-linked* oligosakarida dengan ujung β -N-Acetyl Galactosamine (β -GalNAc) (Van den Steen *et al*, 1998).

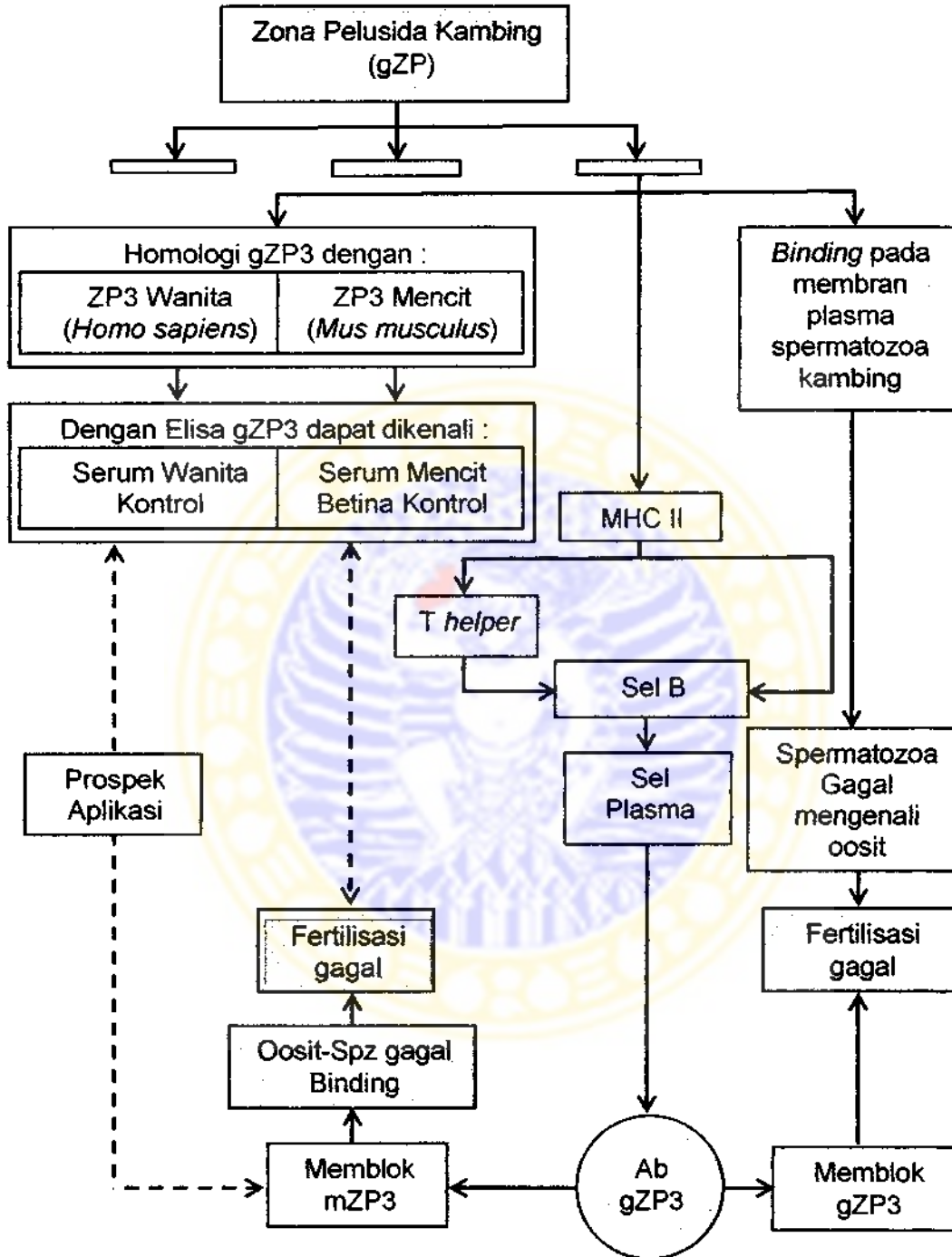
Reproduksi pada mamalia dimulai dari penyatuan sel spermatozoa dengan sel telur. Kedua gamet mengandung antigen pada permukaan selnya yang bersifat unik, *tissue specific*, dan imunogenik. Pengikatan antigen tersebut dengan antibodinya menimbulkan kegagalan fertilisasi (Bazer *et al*, 2000). Pemblokkan karbohidrat atau protein reseptor pada zona pelusida maupun spermatozoa akan berlanjut pada efek kontrasepsi (Bazer *et al*, 2000 ; Barber dan Fayer-Hosken, 2000).

Pada hewan coba, imunogen gZP3 ditangkap oleh sel limfosit B. Sel B kemudian berdeferensiasi menjadi sel Blast, selanjutnya menjadi sel Plasma penghasil antibodi (Abbas *et al*, 2003 ; Goldsby *et al*, 2000). Selain itu, gZP3 juga mengalami internalisasi oleh sel-sel dendritik sebagai *antigen presenting*

cells (APC). Peptida gZP3 mengalami proses fragmentasi menjadi bagian-bagian invarian dan varian epitop. Bagian invarian akan mengalami proses enzimatik lebih lanjut dalam lisosom untuk kemudian dibuang. Fragmen varian epitop membentuk kompleks dengan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) II yang dipasok oleh aparat Golgi, selanjutnya dipaparkan dipermukaan APC. Sel-sel T *helper* mengenali kompleks epitop gZP3 – MHC II pada permukaan APC melalui reseptor CD4⁺ sehingga mengaktifasi sel T untuk memproduksi sitokin. Sitokin menyebabkan sel B berinteraksi dengan T *helper* sehingga sel B berdeferensiasi menjadi sel plasma penghasil antibodi dan sel-sel memori (Austyn dan Wood, 2000 ; Abbas *et al*, 2003 ; Goldsby *et al*, 2000). Menurut Barber dan Fayrer-Hosken (2000), antibodi hasil imunisasi tersebut akan terikat secara sterik pada glikoprotein ZP3 pada zona pelusida oosit sehingga menyebabkan tidak terjadi fertilisasi.

Pada peristiwa fertilisasi terjadi ikatan antara *multiple receptors* pada zona pelusida dengan *multiple ligand* pada permukaan membran plasma spermatozoa (Thaler dan Cardullo, 1996 ; Yonezawa *et al*, 2001). Oleh karena itu, pengaruh antibodi terhadap angka infertilitas setelah pemakaian imunokontrasepsi pada hewan coba bersifat tergantung dosis (*dose dependent*) baik pada percobaan *in vivo* (Mustofa dkk, 2004a), maupun pada percobaan menggunakan teknik fertilisasi *in vitro* (Jewgenow *et al*, 2000).

Secara skematis Kerangka Konseptual Penelitian ini digambarkan sebagaimana Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

□ : Konsep yang diamati

3.2 Hipotesis Penelitian

Penelitian eksploratif laboratorik untuk mengidentifikasi, mengisolasi, dan karakterisasi konstituen ketiga protein zona pelusida kambing (*goat Zona Pellucida-3*, gZP3) tidak menggunakan hipotesis. Hipotesis yang diajukan untuk penelitian eksperimental adalah sebagai berikut :

3.2.1 Isolat protein zona pelusida-3 kambing (*goat zona pellucida-3*, gZP3) merupakan reseptor fertilisasi, sehingga :

- a. antibodi gZP3 menghambat ($p < 0,05$) kemampuan oosit kambing untuk dibuahi oleh spermatozoa kambing pada teknik fertilisasi *in vitro*.
- b. protein gZP3 menghambat ($p < 0,05$) kemampuan spermatozoa kambing untuk membuahi oosit kambing pada teknik fertilisasi *in vitro*

3.2.2 Protein gZP3 mempunyai potensi imunokontraseptif pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) model, sehingga :

- a. antibodi gZP3 dapat menghambat ($p < 0,05$) kemampuan oosit mencit (*Mus musculus*) untuk mencegah pembuahan secara *in vitro*.
- b. antibodi gZP3 dapat menghambat ($p < 0,05$) kemampuan oosit mencit (*Mus musculus*) untuk mencegah ikatannya dengan spermatozoa dalam *Binding Assay*.

BAB 4 METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimental murni dalam skala laboratorium. Secara operasional, penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap. Penelitian tahap pertama adalah penelitian kualitatif eksploratif laboratorik. Pada tahap ini dilakukan identifikasi, isolasi, dan karakterisasi protein gZP3. Identifikasi dilakukan untuk mengetahui konstituen protein pada zona pelusida kambing, sebelum dilanjutkan dengan isolasi protein yang diduga sebagai reseptor fertilisasi, yaitu gZP3. Karakterisasi dimaksudkan untuk mengetahui massa molekul relatif (Mr), berikut proporsi massa masing-masing, peneraan dengan densitometri, uji *imuno blotting* dan uji imunofluoresen.

Pada penelitian tahap kedua dilakukan uji fertilisasi *in vitro* pada kambing, untuk membuktikan bahwa isolat yang diperoleh benar-benar merupakan *sperm resceptor*. Antibodi gZP3 dipakai sebagai suplemen pada media maturasi oosit, sedangkan protein gZP3 dipakai sebagai suplemen pada media kapasitasasi spermatozoa kambing. Spermatozoa dan oosit kambing selanjutnya secara terpisah dilakukan fertilisasi *in vitro*.

Pada penelitian tahap ketiga dilakukan uji fertilisasi *in vitro* dan uji *Binding (Binding assay)* pada mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba model untuk konfirmasi potensi imunokontraseptif gZP3 secara heterolog. Oosit mencit diinkubasi dalam media yang mengandung antibodi gZP3, kemudian dilakukan diuji dengan teknik fertilisasi *in vitro* dan *Binding Assay*.

4.1. Penelitian I :

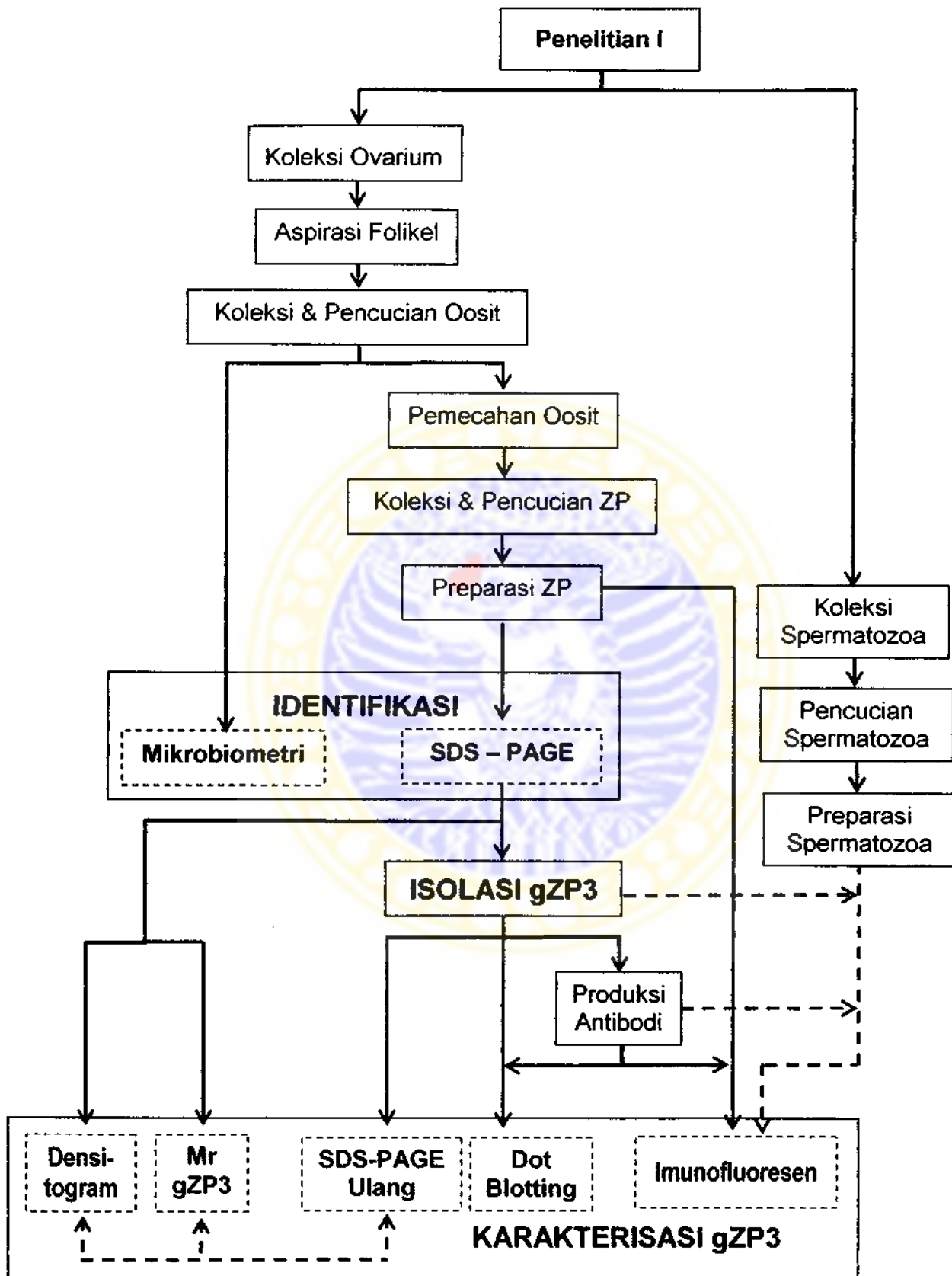
Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing

Penelitian ini terdiri dari preparasi gZP, *Sodium Dodecyl Sulphuric Acid-Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) gZP, isolasi gZP3, densitometri gel hasil SDS-PAGE, produksi antibodi gZP3 dari mencit (*Mus musculus*) dan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) berikut uji Elisa dan uji dot blot, serta uji imunofluoresen protein gZP3 dan antibodi gZP3 (Gambar 4.1).

4.1.1 Bahan dan Alat Penelitian

Ovarium kambing dan semen kambing (*Capra hircus*), *phosphate buffer saline* (PBS), *ammonium peroxo disulphate* (APS), *N,N,N',N'- tetra methyl ethylen diamin* (TEMED), Naphtol, larutan NaCl fisiologis, *Laemli buffer*, Bio-Rad marker *High Range SDS-PAGE Standards*, *silver stain SDS-PAGE Standards*, *anti mice IgG* berlabel *fluorescence iso thio cyanate* (FITC), mikroplat Elisa, *bovine serum albumine* (BSA), NaN_3 , triton x-100, dan *rabbit anti mouse IgG* terlabel alkaline phosphatase.

Alat-alat penelitian : gelas Beaker, Erlenmeyer, pipet Eppendorf, *disposable syringe* dengan jarum 18G atau 21G, cawan petri 3,5 dan 10 cm, *Disecting microscope* (Meiji, EMT), *Tuberculin syringe*, *Sentrifuge* (Hettich), *Ultrasonic homogenizer*, *Vortex mixer* (Thermoline, USA), *electrophoresis set mini protein gel* vertikal dan horisontal (Bio-Rad).



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian Tahap Pertama.

4.1.2 Prosedur Pengumpulan Data

Pengumpulan oosit dari ovarium dilakukan dengan cara aspirasi folikel-folikel berukuran 2 - 5 mm menggunakan *disposable syringe* 5 ml dengan jarum 18G atau 21G yang sudah diisi larutan PBS steril. Hasil koleksi ditampung dalam tabung Eppendorf 15 ml. Pemipetan berulang dengan pipet Eppendorf dilakukan untuk membebaskan oosit dari sel-sel korona radiata atau sel-sel kumulus yang masih melekat kuat pada oosit. Setelah dibiarkan selama 15 menit untuk mengendapkan oosit, seperempat bagian supernatan dibuang, suspensi yang tersisa dituangkan ke dalam cawan petri berdiameter 10 cm steril kemudian digoyang agar merata.

Oosit di cawan petri dihisap dari reruntuhan jaringan ovarium menggunakan pipet mikro yang dibuat dari *capiler plain tube* dengan pengamatan menggunakan mikroskop *disecting* pada pembesaran 40 kali. Sebanyak 5 – 10 oosit yang dihisap dalam pipet mikro ditampung dalam cawan petri berdiameter 3,5 cm yang berisi PBS. Pencarian dan penghisapan oosit diteruskan sampai oosit di dalam cawan petri 10 cm habis. Oosit yang terkumpul masih disertai reruntuhan sel-sel kumulus dalam media PBS. Oosit dibebaskan dari reruntuhan sel dengan cara memindahkan oosit-oosit tersebut ke media PBS yang baru dalam cawan petri 3,5 cm dengan pemipetan. Cara ini diulangi sekali lagi, sehingga didapat oosit kambing yang telah bersih dari debris.

a. Identifikasi dan Isolasi Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing

Mikrobiometri gZP

Pengukuran mikrobiometri gZP dilakukan pada 20 sampel oosit menggunakan mikrometer okuler (Meiji, EMT) pada mikroskop cahaya (Meiji, EMT) dengan pembesaran 40 dan 100 kali. Variabel yang diukur adalah diameter total oosit dan tebal gZP. Berdasarkan dua besaran tersebut dapat dihitung volume gZP menggunakan rumus volume bola oosit berdasarkan rata-rata diameter total oosit dikurangi volume bola berdasarkan diameter rata-rata total oosit dikurangi rerata tebal gZP.

Persiapan Sampel

Pemecahan oosit untuk mengeluarkan ooplasma dilakukan secara manual menggunakan dua jarum tuberkulin dengan pengamatan melalui mikroskop *disecting* pada pembesaran 40 kali. Zona pelusida kambing yang telah terpisah dari ooplasma dihisap satu per satu sambil dihitung jumlahnya, dicuci tiga kali dalam PBS kemudian dikumpulkan pada tabung Eppendorf 1,5 ml untuk diproses lebih lanjut.

Material zona pelusida dalam tabung Eppendorf difraksinasi dengan sonikasi menggunakan *Ultrasonic homogenizer* pada frekuensi 25 KHz selama lima menit yang dilakukan secara bertahap,

yaitu dua menit, dua menit dan satu menit. Sampel hasil sonikasi gZP ditambah Naphtol hingga konsentrasinya 0,1%, selanjutnya divortex dan didiamkan pada suhu ruang selama 20 menit agar zona pelusida terfraksinasi lebih kecil-kecil lagi menjadi konstituen-konstituen zona pelusida 1, 2 dan 3.

Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

Penentuan masing-masing komponen gZP berdasarkan massa molekul relatif (Mr) dilakukan dengan SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis*) menggunakan alat *electrophoresis set mini protein gel* (Bio-Rad).

Pada penelitian ini menggunakan *running gel* dengan konsentrasi 12 %. *Running gel* dibuat dengan mencampur semua bahan kecuali *ammonium peroxy disulphate* (APS) dan *N,N,N',N'- tetra methyl ethylen diamin* (TEMED), kemudian didiamkan selama 10 menit. APS dan TEMED ditambahkan, dikocok sebentar kemudian dimasukkan dalam *plate* melalui dindingnya sampai 1 cm dari ujung atas *plate*. Ke dalamnya kemudian ditambahkan butanol sampai penuh dan dibiarkan 10-30 menit sampai gel mengeras.

Stacking gel dibuat dengan cara yang sama dengan pembuatan *running gel*. Setelah *running gel* mengeras larutan *stacking gel* dituang diatasnya dan dipasang sisiran kemudian diinkubasi selama 25 menit

sampai gel mengeras dan terbentuk sumuran. *Plate* dipasang pada alat *elektrophoresis*, dan *running buffer* sebanyak 800 ml dituangkan pada alat tersebut.

Sampel zona pelusida kambing diencerkan dengan larutan NaCl fisiologis dengan perbandingan 1 : 3 kemudian dicampur dengan RSB (*reducing sample buffer*), yaitu *Laemli buffer* (1:1). Sampel dalam tabung Eppendorf dipanaskan 50°C selama 3 detik dan selanjutnya dimasukkan ke dalam tiap sumuran masing-masing 20 µl. Marker, *High Range SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad) dengan volume yang sama juga dimasukkan ke salah satu sumuran. *Running* dilakukan dengan arus konstan 40 mA dengan tegangan 125 Volt selama 2,5 jam atau sampai sampel turun semua di atas dasar gel.

Gel hasil *running* dicuci empat kali dengan larutan pencuci I sampai dengan IV dalam cawan petri sambil digoyang dengan frekuensi 42 per menit, masing-masing 30 menit. Pewarnaan gel dilakukan dengan *silver stain SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad) dalam petri sambil tetap digoyang selama 15 menit. Setelah itu gel dicuci dua kali dengan aquades 100 ml masing-masing 2 menit kemudian ditambah larutan pengembang warna. Larutan penyelop reaksi pewarnaan dimasukkan sambil tetap digoyang apabila *band-band* pada gel yang diharapkan sudah tampak cukup jelas.

Elusi Protein gZP3

Elektroelusi dilakukan dengan memasukkan potongan *band* pada gel hasil SDS-PAGE ke dalam kantong selofan sepanjang kurang lebih 10 cm dengan tetap dijaga agar posisi gel tidak melengkung. Bagian bawah dan atas selofan diikat dengan benang, kemudian dimasukkan alat elektroforesis horisontal (Bio-Rad). Alat elektroforesis Bio-Rad diisi dengan *E buffer* sebanyak 500 ml dalam posisi *buffer* melebihi kawat. *Running* elektroelusi dilakukan pada kondisi 150 Volt, 40 mA selama 2 jam. Cairan hasil elektroelusi ditampung dalam tabung Eppendorf, disimpan pada suhu -70°C , siap dipakai untuk penelitian berikutnya.

b. Karakterisasi Sifat Immunogen gZP3

Analisis Isolat Protein gZP3 dengan SDS-PAGE

Cairan hasil elektroelusi di-*running* ulang dalam SDS-PAGE untuk konfirmasi apakah protein yang diisolasi benar-benar berasal dari *band* ketiga gel hasil *running* pertama terhadap gZP.

Densitometri

Gel-gel hasil SDS-PAGE dikeringkan untuk memudahkan pemeriksaan dengan densitometri dan mencegah kerapuhan secara fisik. Selanjutnya gel hasil SDS-PAGE gZP dan gel hasil SDS-PAGE ulang hasil elusi diperiksa dalam Densitometer apparatus. Hasil pemeriksaan dengan Analisis Densitometri ini dimaksudkan untuk

mengkonfirmasi *band-band* hasil SDS-Page protein zona pelusida kambing dan hasil elusi protein gZP3 serta untuk mengetahui proporsi protein dalam gel.

Penghitungan Mr gZP3

Penghitungan massa molekul relatif masing-masing konstituen gZP dilakukan berdasarkan manual *SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (Catalog Number 161-0317, Bio-Rad). Jarak migrasi masing-masing marker maupun sampel pada gel diukur menggunakan mikrometer. Data jarak antar *band* pada *lane marker* dan data Mr masing-masing *marker* dibuat persamaan regresi linier menggunakan aplikasi statistik *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) Seri 10.5 (Santosa, 2001). Berdasarkan persamaan regresi tersebut Mr masing-masing konstituen zona pelusida kambing ditentukan.

Produksi Antibodi

Antibodi gZP3 asal mencit (*Mus musculus*) didapat dari hasil imunisasi sepuluh ekor mencit betina. Hewan coba diimunisasi menggunakan 0,05 ml dosis 40 µg gZP3 dalam 0,05 ml *Freund adjuvant* dengan *booster* dua kali masing-masing dengan interval 14 hari. Sepuluh ekor mencit (*Mus musculus*) betina yang lain disuntik dengan 0,1 ml NaCl fisiologis sebagai kontrol, bersamaan dengan waktu penyuntikan hewan coba perlakuan. Pada imunisasi pertama

digunakan *Complete Freund adjuvant* (CFA), sedangkan pada penyuntikan dua kali *booster* (penyuntikan kedua dan ketiga) digunakan *Incomplete Freund adjuvant* (IFA).

Pengambilan contoh darah untuk mendapatkan serum dilakukan lima hari setelah *booster* kedua dari vena orbitalis. Darah diambil dari vena orbitalis menggunakan *capiler plain tube* 0,1 ml, ditampung dalam tabung Eppendorf kemudian didiamkan 10 menit dalam suhu kamar. Serum dapat diperoleh dengan cara melakukan sentrifugasi darah dalam tabung Eppendorf dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit, sehingga terbentuk dua lapisan. Supernatan yang terjadi merupakan serum, dihisap dengan pipet sedangkan endapan eritrosit dibuang. Serum disimpan beku pada suhu -20°C sampai dibutuhkan.

Antibodi gZP3 asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dibuat dengan melakukan imunisasi dua ekor kelinci jantan menggunakan 200 μg gZP3 dalam *Freund adjuvant* dengan dua kali *booster* interval dua minggu. Contoh darah diambil dari vena auricularis sebelum imunisasi pertama (sebagai serum pre imun) dan tujuh hari setelah *booster* terakhir (sebagai serum post imun).

Peneraan titer antibodi serum dilakukan dengan Elisa indirek. Suspensi gZP3 10 $\mu\text{l/ml}$ diencerkan dengan bufer posfat karbonat (50 mmol/l , pH 9,6) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat Elisa 100

μl /sumuran dan diinkubasi pada 4°C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* (1 % BSA, 0,02 % NaN_3 dalam PBS) dan diinkubasi satu jam pada 37°C . Selanjutnya mikroplat dicuci dengan buffer pencuci (0,15 M *NaCl*, 0,05 % triton x-100, 0,02 % NaN_3) tiga kali.

Serum dalam beberapa pengenceran dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 μl dan diinkubasi satu jam pada 37°C , setelah itu dicuci tiga kali dengan bufer pencuci. Ditambahkan konjugat (*rabbit anti-mouse* IgG terlabel alkaline posfatase untuk serum mencit dan *rabbit anti-human* IgG terlabel alkaline posfatase untuk serum wanita kontrol) yang diencerkan dengan *buffer blocking* dengan pengenceran 1 : 1.000 sebanyak 100 μl /sumuran. Inkubasi selama satu jam pada 37°C . Mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci kemudian ditambah substrat (2,7 mmol / liter larutan 4-nitrofenil posfat dalam 1 M dietanolamin, 0,5 MgCl_2 , 0,02 % NaN_3 pH 9,8) sebanyak 100 μl / sumuran. Inkubasi kembali selama 10 – 30 menit dalam ruang gelap. Resapan dibaca dengan ELISA *reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Data titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dianalisis dengan uji t menggunakan program aplikasi statistik SPSS *for Windows* pada tingkat kepercayaan 5 % (Santosa, 2001).

Uji *Dot Blotting*

Analisis *Dot blotting* dilakukan untuk memastikan bahwa antibodi pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dan mencit (*Mus musculus*) hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 (AbgZP3). Metode *Dot blotting* dilakukan dengan metode De Maio (1994) sebagai berikut. Kertas *nitrocellulose membrane* (NCM) empat lembar masing-masing berukuran 4 x 4 cm, diformat berbentuk tabel 4 baris x 2 kolom menggunakan *ballpoint*. Dua lembar kertas NCM untuk *Dot blotting* serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), diberi identitas R1 dan R2, dan dua lembar yang lain untuk *Dot blotting* serum mencit (*Mus musculus*) dengan identitas M1 dan M2. Kertas NCM direndam dalam *Tris Buffered Saline* (TBS) selama 15 menit, kemudian dikeringkan pada suhu ruang 5 menit.

Antigen protein gZP3 dengan konsentrasi 0,15 µg, 0,12 µg, 0,09 µg, dan 0,06 µg berturut-turut diteteskan pada empat baris dari atas ke bawah kertas NCM kolom sebelah kiri, sedangkan kolom sebelah kanan ditetesi blangko sebagai kontrol. Kertas NCM selanjutnya dibiarkan 5 menit pada suhu ruang. Blocking dilakukan dengan *buffer blocking* yang mengandung 5 % susu skim selama satu jam. Kertas NCM dicuci dengan TBS Tween (TBS-T) selama 5 menit tiga kali, selanjutnya dikeringkan di udara pada suhu ruang.

Pemaparan antibodi primer , yaitu AbgZP3 asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dan asal mencit (*Mus musculus*) dilakukan dalam cawan petri berdiameter 10 cm secara terpisah. Antibodi primer masing-masing dengan pengenceran 1/25 dan 1/50 sebanyak 25 μ l dilarutkan dalam TBS-T mengandung susu skim 1 %. Pemaparan AbgZP3 asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dengan pengenceran 1/25 dan 1/50 dilakukan pada kertas NCM dengan identitas R1 dan R2, sedangkan AbgZP3 asal serum mencit (*Mus musculus*) dengan pengenceran 1/25 dan 1/50 dipaparkan pada kertas NCM dengan identitas M1 dan M2. Perendaman dalam antibodi primer dilakukan selama 1 jam di atas *shaker* 42 per menit, selanjutnya kertas NCM dicuci dengan TBS-T tiga kali.

Pemaparan antibodi sekunder, yaitu *conjugate anti mouse* atau *conjugate anti rabbit IgG* terlabel *Alkaline Phosphatase* dilakukan seperti pemaparan antibodi primer. Antibodi sekunder 25 μ l dilarutkan dalam TBS-T yang mengandung susu skim 1 %. Perendaman NCM dilakukan selama 2 jam di atas *shaker* dengan frekuensi 42 per menit, selanjutnya NCM dicuci tiga kali dalam TBS. Substrat sebanyak 25 μ l dipaparkan selama satu jam sambil digoyang di atas *shaker* dengan frekuensi 42 per menit. Reaksi dihentikan dengan memindahkan NCM ke dalam aquades apabila sudah muncul hasil *dot blotting* berwarna abu-abu keunguan.

Uji Imunofluoresen

Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan konfirmasi bahwa isolat protein gZP3 yang diperoleh benar-benar adalah reseptor primer pada zona pelusida yang berperan pada pengenalan spermatozoa kambing. Deteksi pengenalan antibodi gZP3 dilakukan terhadap zona pelusida kambing dan gZP3 terhadap spermatozoa kambing (Tabel 4.1) menggunakan metode Beesley (1993).

Tabel 4.1 Karakterisasi gZP3 dan Antibodi gZP3 terhadap Spermatozoa dan Zona pelusida Kambing

Spesimen	Reaksi	Reaksi Harapan
Kontrol	GZP + Ab _{II}	Tidak fluoresensi
Perlakuan	GZP + Ab _I + Ab _{II}	Fluoresensi
Kontrol	Spermatozoa + Ab _I + Ab _{II}	Tidak fluoresensi
Perlakuan	Spermatozoa + gZP3 + Ab _I + Ab _{II}	Fluoresensi

Keterangan :

- gZP : zona pelusida kambing
- Ab_I : Antibodi gZP3
- Ab_{II} : *Anti mice* IgG terlabel FITC.

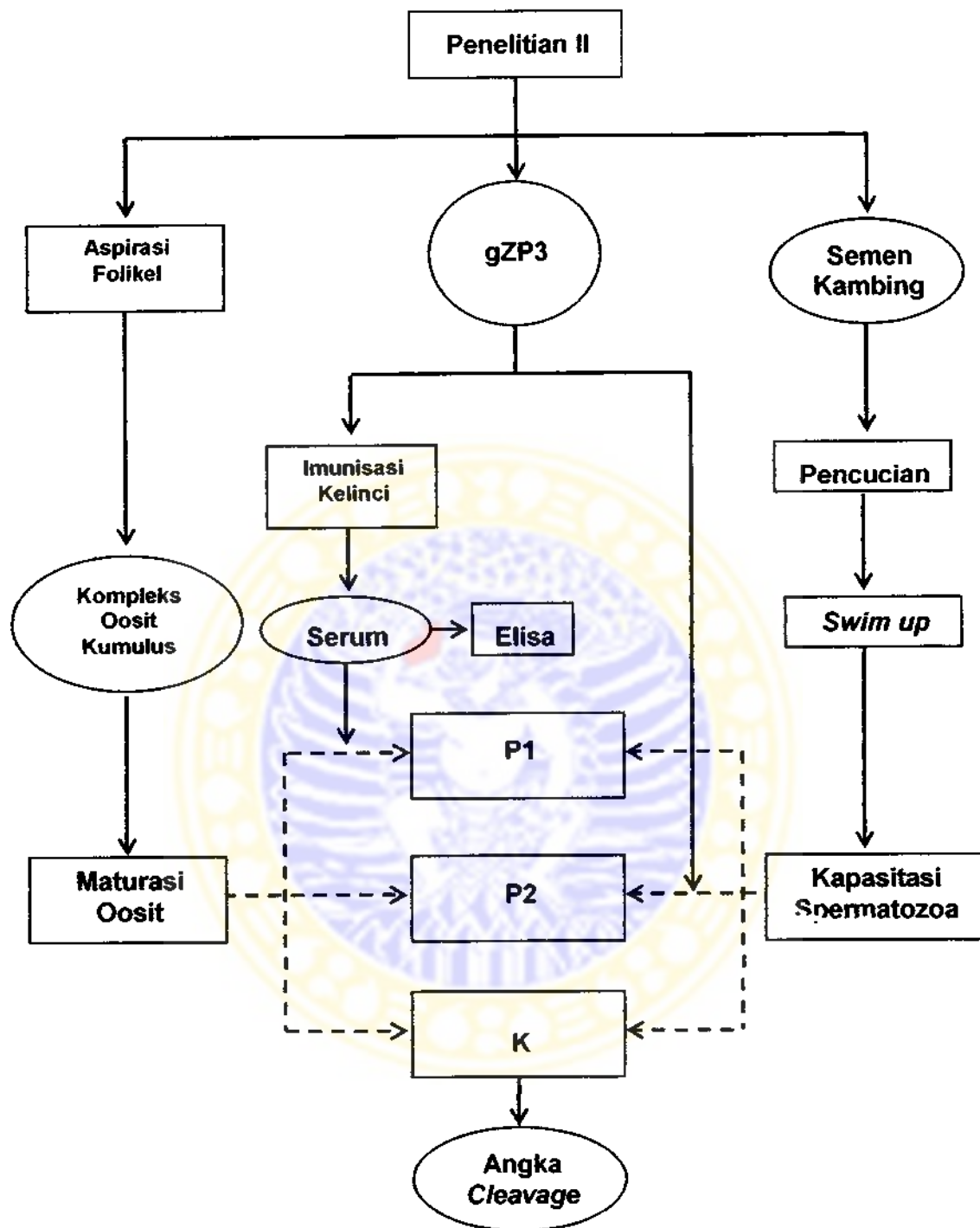
Indikator bagi reaksi pengenalan tersebut adalah antibodi sekunder, yaitu *anti mice* IgG berlabel *fluorescence iso thio cyanate* (FITC). Kontrol dibuat untuk memastikan bahwa antibodi sekunder tidak dapat terikat pada gZP maupun spermatozoa kambing, sehingga tidak berfluoresensi (Beesley, 1993).

Zona pelusida kambing disiapkan dari oosit kambing sebagaimana metode yang telah digunakan di atas. Zona pelusida kambing secara manual dicuci tiga kali masing-masing dengan sentrifugasi 700 g selama 10 menit. Pelet yang diperoleh difraksinasi dengan metode sonikasi menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* pada frekuensi 25 KHz selama 5 menit.

Sampel hasil sonikasi zona pelusida dibuat preparat ulas di atas gelas obyektif, selanjutnya dikeringkan di udara pada suhu ruang. Fiksasi dilakukan dengan metanol 70 % selama 60 menit. Pada sediaan tersebut selanjutnya dituangkan serum mencit (*Mus musculus*) yang mengandung antibodi gZP3, diinkubasi pada suhu 37° C 60 menit, kemudian dicuci dengan PBS yang mengandung *foetal calf serum* (FCS) 1 % selama 15 menit. Langkah berikutnya adalah antibodi sekunder (*anti mice IgG* berlabel *fluorescence iso thio cyanate*, FITC) ditambahkan, kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37° C selama 60 menit, sekali lagi sediaan ulas dicuci dengan cara seperti tersebut di atas. Preparat selanjutnya dikeringkan di udara, dan siap diperiksa. Preparat kontrol dibuat seperti tersebut di atas, tanpa penambahan serum yang mengandung gZP3. Imunofluoresen positif (antibodi gZP3 mengenali homogenat zona pelusida kambing) apabila preparat berfluoresensi, sedangkan negatif apabila preparat tidak berfluoresensi pada pemeriksaan dengan mikroskop ultra violet.

Satu tetes suspensi spermatozoa hasil proses *swim up* dibuat preparat ulas di atas gelas objek, dikeringkan di udara pada suhu ruang kemudian difiksasi dengan metanol selama 60 menit. Selanjutnya di atas permukaan sediaan dituangkan suspensi gZP3, diinkubasi pada inkubator CO₂ 5 % dengan kelembaban 95 – 99 %, suhu 37° C selama 60 menit. Setelah inkubasi, sediaan kemudian dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) yang mengandung *foetal calf serum* (FCS) 1 % selama 15 menit. Serum mencit (*Mus musculus*) yang mengandung antibodi gZP3 dituangkan di atasnya, kemudian diinkubasi dan kembali dicuci seperti tersebut di atas. Antibodi sekunder (*anti mice* IgG dengan label FITC) ditambahkan, kemudian diinkubasi dan sekali lagi dicuci dilanjutkan dengan ditetesi gliserol 50 % dan ditutup dengan *cover glass*. Preparat siap diperiksa dengan mikroskop fluoresen. Preparat kontrol dibuat seperti tersebut di atas, tanpa serum mengandung antibodi gZP3.

Uji imunofluoresen positif (protein gZP3 mengenali membran plasma spermatozoa) apabila terdapat warna fluoresensi, warna kekuningan berpendar pada membran plasma daerah kepala spermatozoa kambing dalam pengamatan preparat menggunakan mikroskop ultra violet. Pada kontrol fluoresensi pada kepala spermatozoa kambing tidak terjadi.



Gambar 4.2. Kerangka Operasional Penelitian Tahap Kedua (K : Kontrol, P1 : Perlakuan I, P2 : Perlakuan II)

4.2.2 Populasi, Sampel dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah sejumlah kumulus oosit kompleks kambing yang diperoleh dari hasil aspirasi folikel-folikel pada ovarium yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH). Sampel penelitian ini adalah 450 buah kumulus oosit kompleks kambing dibagi secara acak menjadi tiga kelompok, masing-masing terdiri dari 10 ulangan @ 15 buah oosit. Pada kelompok Kontrol, maturasi oosit menggunakan media *Tissue Culture Medium – 199* (TCM-199) dengan suplemen *foetal calf serum* (FCS) dan kapasitasi spermatozoa menggunakan media EBSS. Kelompok Perlakuan I (P1), maturasi oosit menggunakan media TCM-199 dengan suplemen 10 % serum Kelinci yang telah diimunisasi dengan 200 µg gZP3, mengandung antibodi (Ab) gZP3 dan kapasitasi spermatozoa dilakukan seperti pada kelompok kontrol. Pada kelompok Perlakuan II (P2), maturasi oosit dilakukan seperti pada kelompok kontrol namun pada media kapasitasi spermatozoa ditambahkan 10 % gZP3.

Penentuan besar sampel dilakukan dengan rumus :

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma_D^2}{\delta^2}$$

$$n = (1,65 + 0,85)^2$$

$$n = 6,25 \approx 10$$

Keterangan : n = jumlah sampel tiap perlakuan,
 Z_{α} = peluang nilai acak untuk kesalahan jenis I ($\alpha = 0,05$),
 Z_{β} = peluang nilai acak untuk kesalahan jenis II ($\beta = 0,10$),
 σ_D^2 = ragam beda populasi,
 δ = galat penarikan contoh (Steel dan Torrie, 1993).

4.2.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah suplementasi serum yang mengandung antibodi gZP3 pada media maturasi oosit, suplementasi gZP3 pada media kapasitas spermatozoa dan kontrol, sedangkan variabel tergantung adalah Angka *Cleavage*. Variabel kendali pada penelitian ini adalah prosedur dan media preparasi semen, maturasi oosit dan fertilisasi *in vitro*. Variabel moderator adalah kualitas spermatozoa yang digunakan.

4.2.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Antibodi gZP3 adalah antibodi yang terdapat pada serum asal Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) setelah diimunisasi dengan protein gZP3.
- b. Antigen gZP3 adalah protein gZP3 hasil isolasi fraksi ketiga protein zona pelusida yang teridentifikasi pada SDS-PAGE.
- c. Protein gZP3 asal oosit kambing disimpulkan sebagai reseptor pengenalan spermatozoa untuk fertilisasi apabila suplementasi antibodi gZP3 dalam media maturasi oosit kambing *in vitro* menurunkan ($p < 0,05$) kemampuan oosit untuk dibuahi.
- d. Protein gZP3 asal oosit kambing disimpulkan sebagai reseptor pengenalan spermatozoa untuk fertilisasi apabila suplementasi protein tersebut dalam media kapasitas spermatozoa kambing

menurunkan ($p < 0,05$) kemampuan spermatozoa untuk membuahi.

- e. Kegagalan pembuahan pada penelitian ini diukur berdasarkan tidak berkembangnya *cleavage* 48 jam setelah inseminasi *in vitro*.
- f. *Cleavage* adalah stadium embrio yang telah mengalami pembelahan tanpa diikuti penambahan massa sel.

4.2.5 Bahan Penelitian

Ovarium dan semen beku kambing, *oocyte washing solution* (OWS), *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS), *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199), *Foetal calf serum* (FCS) dan antibodi gZP3.

4.2.6 Prosedur Pengumpulan Data

a. Produksi Antibodi gZP3

Antibodi gZP3 dibuat dengan melakukan imunisasi dua ekor kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan menggunakan 200 μg gZP3 dalam *Freund adjuvant* dengan dua kali *booster* interval dua minggu. Contoh darah diambil dari vena auricularis sebelum imunisasi pertama (sebagai serum pre imun) dan tujuh hari setelah *booster* terakhir (sebagai serum post imun). Analisis titer antibodi dilakukan dengan Elisa indirek.

b. Pemrosesan Kering Beku Serum dan gZP3

Serum hewan coba setelah imunisasi (post imun) dan antigen protein gZP3 dikeringbekukan untuk memudahkan pemakaian dalam suplementasi media. Proses pengering beku dilakukan di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga. *Freez dryer apparatus* disiapkan selama satu jam sedemikian rupa sehingga pendingin bekerja optimum. Sampel dalam keadaan beku dikeluarkan dari *freezer* untuk dimasukkan kedalam *Freez dryer apparatus*, kemudian mesin pompa vakum dijalankan, ditunggu sampai sampel kering beku.

c. Suplementasi Media

Serum kelinci post imunisasi dalam keadaan kering beku diencerkan dengan TCM-199 sebanyak volume serum semula menggunakan pipet Eppendorf, kemudian dihomogenkan. Antigen gZP3 dalam keadaan kering beku ditambah dengan media EBSS sebanyak volume semula menggunakan pipet Eppendorf, kemudian juga dihomogenkan.

d. Fertilisasi *in vitro*

Maturasi oosit, preparasi spermatozoa, dan inseminasi *in vitro* dilakukan sesuai dengan prosedur rutin fertilisasi *in vitro* di Sub Laboratorium Fertilisasi *in vitro*, Laboratorium Kebidanan Veteriner

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (Mahaputra dkk, 1998 ; Mahaputra dan Mustofa, 2000).

Maturasi Oosit

Sepuluh sampai 20 buah ovarium kambing diambil dari rumah potong hewan (RPH) Pegirian Surabaya untuk setiap kali proses fertilisasi *in vitro*. Ovarium tersebut dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi campuran larutan garam fisiologis dan antibiotika sebagai media transpor, dengan suhu 36°-38°C. Semua folikel yang berdiameter 1-5 mm dilakukan aspirasi dari bagian ovarium yang berlawanan dengan keberadaan folikel tersebut. Aspirasi dilakukan dengan alat suntik *disposable* yang berisi cairan pencuci oosit (*oosit washing solution*, OWS) dengan jarum 18G . Dengan satu kali tusukan langsung dihisap 3-4 folikel. Aspirasi oosit dilakukan satu persatu ovarium, sedangkan ovarium yang belum diaspirasi tetap dijaga pada suhu 36 – 38 ° C dalam gelas *Beaker* berisi media pembawa yang diletakkan di atas air penghangat (*waterbath*). Selanjutnya semua oosit yang terkumpul dicuci dengan OWS tiga kali dan terakhir dengan media maturisasi.

Proses maturasi oosit dilakukan dengan memasukkan masing-masing 10 buah oosit ke dalam tiap tetes (50 µl) media maturasi yang telah ditutup minyak parafin. Media maturasi yang

dipakai adalah suplementasi media TCM-199 dengan 1024/ml antibodi gZP3, sebagai kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol yang tidak mengandung antibodi gZP3. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ dengan kelembaban 95-99 % (Thermolyne-USA).

Preparasi Spermatozoa

Straw semen beku kambing dilakukan pencairan dengan air hangat 36 - 38 ° C satu menit, kemudian dimasukkan kedalam tabung kerucut (*cone tube*) yang sudah berisi tiga milliliter *Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS). Selanjutnya dilakukan pencucian spermatozoa dalam suspensi tersebut dengan cara disentrifugasi 700 g 10 menit, sebanyak dua kali sehingga meninggalkan *pellet* sel spermatozoa sekitar 100 µl.

Tiga puluh menit sebelum sentrifugasi semen, disiapkan tetes EBSS 50 µl dalam cawan petri polypropylene 36 mm, dimasukkan inkubator CO₂ (Mahaputra dan Mustofa, 2001). Pada kelompok perlakuan, media EBSS mengandung 13,16 µg/ml antigen gZP3. Setelah sentrifugasi, cairan bagian atas dibuang sehingga tinggal 100 µl cairan bersama *pellet* spermatozoa, selanjutnya ditambahkan 3 ml EBSS. Sediaan didiamkan 30 menit dalam inkubator untuk proses *swimp up*.

Setelah dilakukan perhitungan konsentrasi sel spermatozoa motil, konsentrasi dibuat menjadi 1,2 juta/40 μ l dengan cara menambahkan EBSS. Sebanyak 40 μ l campuran sel spermatozoa ini dimasukkan kedalam tetes lalu kembali diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama satu jam untuk kapasitasasi.

Inseminasi *in vitro*

Semua oosit matang dicuci tiga kali dengan OWS serta sekali dengan EBSS. Sebanyak 10-20 kumulus-oosit-kompleks matang dimasukkan ke dalam masing-masing tetes media yang berisi spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi. Sediaan tersebut dimasukkan kembali dalam inkubator CO₂ selama 48 jam, tiap 24 jam digoyang. Pemeriksaan embrio stadium *cleavage* dilakukan pengamatan dengan mikroskop stereo pada pembesaran 40 kali.

4.2.7 Analisis Data

Data angka *cleavage* diuji dengan Anava pada tingkat kepercayaan 5 %, dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil apabila terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) (Steel and Torrie, 1993). Uji statistik dilakukan menggunakan program aplikasi statistik SPSS *for Windows* pada tingkat kepercayaan 5 % (Santosa, 2001).

4.3 Penelitian III :

A. Uji Potensi Imunokontraseptif Antibodi gZP3 dengan Teknik Fertilisasi *in vitro* pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

4.3.1 Rancangan Penelitian

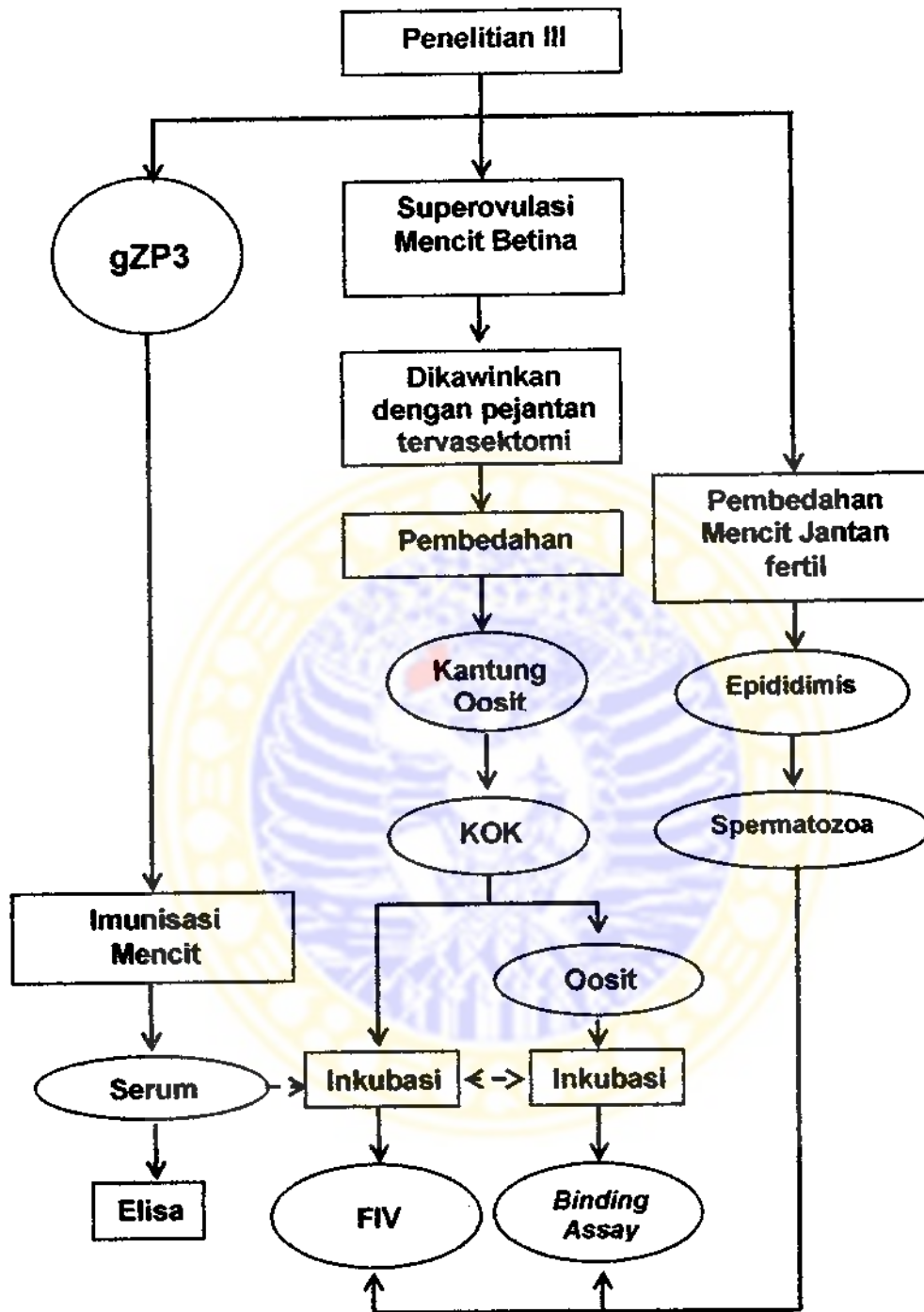
Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan dua macam perlakuan yaitu oosit yang berasal dari kantung fertilisasi oosit mencit (*Mus musculus*) masing-masing untuk kontrol dan perlakuan. Kerangka operasional Penelitian Tahap ketiga dapat dilihat pada Gambar 4.3. Secara skematis rancangan tersebut digambarkan sebagai Tabel 4.3.

Tabel 4.3. Rancangan Penelitian Pengaruh Antibodi gZP3 pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) dalam Fertilisasi *in vitro*

Perlakuan	Hasil	
	<i>Fertil</i>	<i>Non Fertil</i>
Kontrol (Media + 10 % Serum Pre imun)		
Perlakuan (Media + 10 % Serum Post imun)		

4.3.2 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah sejumlah oosit mencit (*Mus musculus*). Sampel penelitian ini adalah oosit dari mencit (*Mus musculus*). Penentuan besar sampel dilakukan dengan rumus seperti pada Penelitian II.



Gambar 4.3. Kerangka Operasional Penelitian Tahap Ketiga (KOK : kompleks oosit - kumulus, FIV : fertilisasi *in vitro*)

4.3.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perlakuan suplementasi dengan serum hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan gZP3 pada media fertilisasi *in vitro* (Media M16). Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kegagalan fertilisasi secara *in vitro*. Variabel kendali pada penelitian ini adalah prosedur superovulasi, kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang digunakan dan media fertilisasi *in vitro*. Variabel moderator adalah proses fertilisasi pada oosit oleh spermatozoa.

4.3.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Antibodi gZP3 adalah antibodi yang terdapat dalam serum asal mencit setelah diimunisasi dengan gZP3 (serum Post Imun). Media fertilisasi *in vitro* disuplementasi dengan 10 % serum : Serum Pre Imun pada Kelompok Kontrol dan Serum Post Imun pada Kelompok Perlakuan.
- b. Protein gZP3 dinyatakan potensial sebagai sediaan imunokontraseptif apabila antibodi gZP3 dalam media fertilisasi menyebabkan terjadinya kegagalan fertilisasi yang diukur berdasarkan penurunan ($p < 0,05$) Angka Fertilisasi antara oosit dan spermatozoa mencit sebagai model.

- c. Kegagalan fertilisasi diidentifikasi berdasarkan tidak terdesintegrasinya sel-sel kumulus dari kompleks oosit kumulus, tidak terbentuknya *polar body II* (PBII) 2 jam setelah inseminasi *in vitro*, dan tidak terbentuknya embrio stadium *cleavage* 4 jam setelah inseminasi *in vitro*.

4.3.5 Bahan Penelitian

Isolat gZP3, *Complete Freund adjuvant*, *Incomplete Freund adjuvant*, *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), *human chorionic gonadotropin* (hCG), oosit dan spermatozoa mencit (*Mus musculus*), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Media M16, minyak mineral, *anti mice IgG* berlabel *alkaline phosphatase* (AP), mikroplat Elisa, *bovine serum albumine* (BSA), NaN_3 , dan triton x-100.

4.3.6 Prosedur Pengumpulan Data

a. Pembuatan serum

Imunisasi 10 ekor mencit (*Mus musculus*) betina dengan 40 μg gZP3 dengan dua kali *booster* interval dua minggu. Pengambilan contoh darah dilakukan sebelum imunisasi (serum pre imun) dan tujuh hari setelah booster terakhir (serum post imun). Analisis titer antibodi dilakukan dengan Elisa indirek.

b. Superovulasi

Mencit (*Mus musculus*) betina 10 ekor disuperovulasi dengan penyuntikan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) 5 iu, dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) 5 iu 48 jam kemudian. Selanjutnya mencit betina dikumpulkan dengan mencit pejantan yang telah divasektomi selama satu malam untuk menggertak ovulasi.

Pengambilan kantung oosit dari oviduk dilakukan 17 jam setelah penyuntikan hCG (Rankin *et al*, 2001). Kantung oosit dicuci tiga kali dengan PBS, dibedah dengan pengamatan mikroskop pada pembesaran 40 kali. Pembedahan kantung oosit dilakukan dengan bantuan *mini pinset* dan jarum tuberkulin. Masing-masing populasi oosit dibagi dua secara acak, sebagai kontrol dan sebagai perlakuan.

c. Fertilisasi *in vitro*

Oosit kelompok kontrol diinkubasi dalam 100 μ l media M16 yang mengandung 10 % serum pre imun, sedangkan oosit kelompok perlakuan diinkubasi dalam 100 μ l media M16 yang mengandung 10 % serum post imun.

Spermatozoa mencit diperoleh dengan cara pembilasan kauda epididimis mencit (*Mus musculus*) pejantan yang telah

terbukti fertil. Epididimis diangkat, kemudian dicuci tiga kali dalam PBS, dan yang keempat dalam media M16. Epididimis dimasukkan ke dalam 0,5 ml media M16, kemudian dengan dua buah pinset mini epididimis dibedah agar populasi spermatozoa menyebar dalam media. Konsentrasi spermatozoa tersebut sekitar 2×10^6 sel / 100 μ l.

Kapasitasi spermatozoa dilakukan pada inkubator 5 % CO₂, suhu 35 ° C selama satu jam. Suspensi spermatozoa sebanyak 100 μ l dalam media M16 ditambahkan dalam oosit, ditutup minyak parafin kemudian diinkubasi pada inkubator 5 % CO₂, pada suhu 37° C untuk fertilisasi.

Fertilisasi dapat diketahui dengan mendeteksi terdegradasinya sel-sel kumulus dan keberadaan *polar body II* (PB II) 2 jam kemudian atau embrio stadium *cleavage* 4 jam kemudian (Rankin *et al*, 2001).

4.3.7 Analisis Data

Data titer antibodi serum sebelum dan sesudah imunisasi dianalisis dengan uji t. Data angka kegagalan fertilisasi diuji dengan Chi-kuadrat. Semua uji statistik dilakukan menggunakan program aplikasi statistik *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows* pada tingkat kepercayaan 5 % (Santosa, 2001).

B. Uji Potensi Imunokontrasptif Antibodi gZP3 dengan *Binding Assay* pada Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

4.4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan dua macam perlakuan yaitu oosit yang berasal dari kantung fertilisasi oosit mencit (*Mus musculus*) masing-masing untuk kontrol dan perlakuan. Perlakuan berupa pemberian suplemen 10 % serum mencit pre imunisasi dan post imunisasi (dari penelitian sebelumnya) pada media untuk inkubasi oosit sebelum dilakukan *Binding assay*. Secara skematis rancangan tersebut digambarkan sebagai Tabel 4.4. Kerangka operasional penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 4.3.

Tabel 4.4 Rancangan penelitian *Binding assay* pada oosit dan spermatozoa mencit (*Mus musculus*)

Perlakuan	Hasil <i>Binding assay</i>	
	Jumlah	<i>Binding Index</i>
Kontrol (Media + 10 % Serum Pre imun)		
Perlakuan (Media + 10 % Serum Post imun)		

4.4.2 Populasi, Sampel, dan Besar Sampel

Populasi penelitian ini adalah sejumlah oosit mencit (*Mus musculus*). Sampel penelitian ini adalah oosit dari mencit (*Mus musculus*) yang diperoleh dari hasil superovulasi menggunakan

hormon *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (hCG). Penentuan besar sampel dilakukan dengan rumus seperti pada Penelitian II.

4.4.3 Variabel Penelitian

Variabel bebas pada penelitian ini adalah perlakuan suplementasi dengan serum hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan gZP3 pada media fertilisasi *in vitro* (Media M16). Variabel tergantung pada penelitian ini adalah kegagalan Angka *Binding*. Variabel kendali pada penelitian ini adalah prosedur superovulasi, kualitas spermatozoa mencit (*Mus musculus*) yang digunakan dan media fertilisasi *in vitro*. Variabel moderator adalah proses pengenalan dan *binding* spermatozoa pada oosit.

4.4.4 Definisi Operasional Variabel

- a. Antibodi gZP3 adalah antibodi yang terdapat dalam serum asal mencit setelah diimunisasi dengan gZP3 (serum Post Imun). Media fertilisasi *in vitro* disuplementasi dengan 10 % serum : Serum Pre Imun pada Kelompok Kontrol dan Serum Post Imun pada Kelompok Perlakuan.
- b. Protein gZP3 dinyatakan potensial sebagai sediaan imunokontraseptif apabila terjadinya penurunan ($p < 0,05$)

Angka *Binding* antara oosit dan spermatozoa *in vitro* mencit sebagai model.

- c. Angka *Binding* pada penelitian ini adalah jumlah sel spermatozoa yang melekat kuat pada oosit di sepanjang keliling lingkaran bidang pandang zona pelusida pada pemeriksaan secara mikroskopis.

4.4.5 Bahan Penelitian

Bahan penelitian pada tahap ini adalah *Complete Freund adjuvant*, *Incomplete Freund adjuvant*, *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), *human chorionic gonadotropin* (hCG), oosit dan spermatozoa mencit (*Mus musculus*), *Phosphate Buffer Saline* (PBS), Media M16, minyak mineral, *anti mice IgG* berlabel *alkaline phosphatase* (AP), mikroplat Elisa, *bovine serum albumine* (BSA), NaN_3 , dan triton x-100.

4.4.6 Prosedur Pengumpulan Data

a. Imunisasi Hewan Coba

Serum yang digunakan pada penelitian ini sama dengan serum yang digunakan pada pengujian potensi imunokontraseptif gZP3 dengan teknik fertilisasi *in vitro* di

atas. Mencit (*Mus musculus*) diimmunisasi dengan 40 µg gZP3 dalam Freund adjuvant dengan dua kali *booster*.

c. Superovulasi

Lima ekor mencit (*Mus musculus*) fertil dilakukan superovulasi dengan penyuntikan *Pregnant Mare Serum Gonadotropin* (PMSG) 5 iu. Penyuntikan *human Chorionic Gonadotropin* (hCG) 5 iu 48 jam kemudian, selanjutnya mencit dikumpulkan dengan pejantan yang telah divasektomi untuk menggerakkan ovulasi. Koleksi oosit dari oviduk dilakukan 17 jam setelah penyuntikan hCG (Rankin *et al*, 2001).

d. Perlakuan *Binding Assay*

Oosit yang telah dikeluarkan dari kantung oosit diinkubasi beberapa detik dalam media M16 yang mengandung 1 % hyaluronidase sambil digoyang dengan pipet sampai semua sel-sel kumulus lepas. Selanjutnya oosit dicuci lima kali dalam media M16. Dua puluh buah oosit dibagi secara acak menjadi dua kelompok. Kelompok pertama diinkubasi dalam media M16 + 10 % serum pre imun, sedangkan kelompok kedua diinkubasi dalam media M16 + 10 % serum post imun. Inkubasi dilakukan dalam inkubator dengan 5 % CO₂ pada suhu 37 °C selama satu jam.

Spermatozoa diperoleh dengan cara pembilasan kauda epididimis mencit pejantan. Konsentrasi sperma dibuat menjadi 2×10^6 sel / ml dalam tetes 50 μ l EBSS, kapasitas dilakukan pada inkubator 5 % CO₂, suhu 37 °C selama satu jam.

Oosit dari masing-masing kelompok dimasukkan ke dalam tetes spermatozoa, ditutup minyak parafin kemudian diinkubasi pada inkubator 5 % CO₂, suhu 37 °C selama satu jam. Selanjutnya oosit dicuci dengan media M16 sebanyak tiga kali untuk melepaskan spermatozoa yang tidak terikat kuat pada zona pelusida. Pemeriksaan jumlah spermatozoa yang terikat kuat pada zona pelusida dihitung dengan mikroskop pada pembesaran 400 kali.

Binding index dihitung dari jumlah sel spermatozoa yang terikat pada zona pelusida oosit kelompok perlakuan serum dibagi dengan jumlah sel spermatozoa yang terikat pada zona pelusida oosit kelompok kontrol dikalikan 100 (WHO, 1992 ; Govind *et al*, 2000 ; Naz *et al*, 2000).

4.4.7 Analisis Data

Data jumlah spermatozoa yang melekat pada oosit dianalisis dengan uji t pada tingkat kepercayaan 5 % (Steel and Torrie, 1993), sedangkan *Binding Index* disajikan secara deskriptif dengan program aplikasi statistik SPSS *for Windows* (Santosa, 2001).

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1 Penelitian I :

Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing (*goat zona pellucida, gZP*)

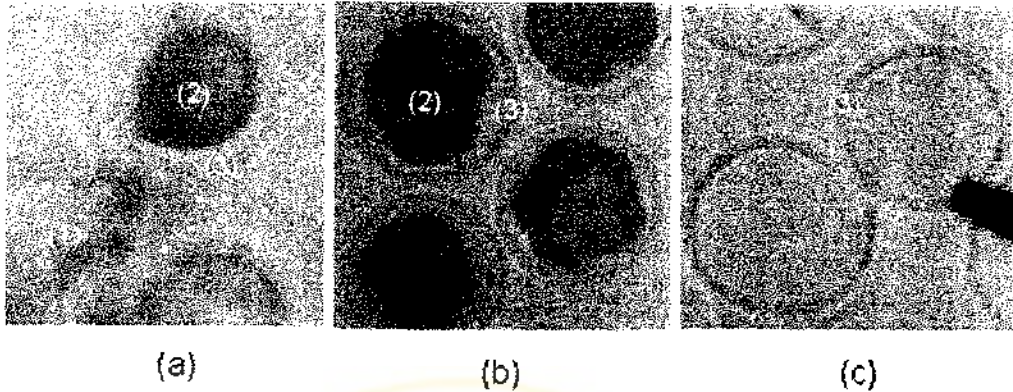
5.1.1 Identifikasi dan Isolasi Protein Reseptor Fertilisasi (ZP3) pada Zona Pelusida Kambing

Mikrobiometri gZP

Pada penelitian ini telah diolah sebanyak 2.116 ovarium kambing, menghasilkan 18.959 oosit. Keberadaan oosit diantara sel-sel kumulus, oosit setelah terbebas dari reruntuhan sel, dan zona pelusida tampak sebagaimana Gambar 5.1.

Pengukuran mikrobiometri oosit kambing menunjukkan bahwa rerata diameter total oosit adalah sebesar $183,89 \pm 12,95 \mu\text{m}$, diameter ooplasma (vitelin) sebesar $147,84 \pm 12,00 \mu\text{m}$, dengan ketebalan zona pelusida $16,63 \pm 1,71 \mu\text{m}$. Penghitungan volume zona pelusida berdasarkan rumus volume bola ($= \frac{4}{3} \pi R^3$) didapat volume per satuan zona pelusida sebesar $849.354,13 \pm 218.315,6 \mu\text{m}^3$ (Lampiran 1).

Dalam proses pemecahan oosit secara manual untuk mendapatkan zona pelusida, beberapa zona pelusida hancur dan tidak dapat dihitung, sehingga dari 18.959 oosit tersebut akhirnya diperoleh 18.235 zona pelusida.



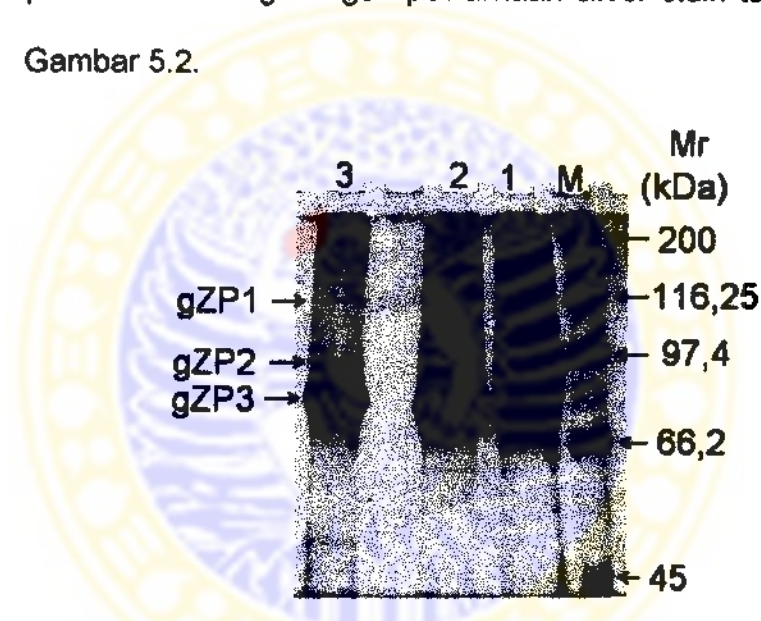
Gambar 5.1 Hasil Koleksi Zona Pelusida Kambing : (a) oosit diantara runtuh sel-sel kumulus, (b) oosit setelah bebas dari runtuh sel-sel kumulus, dan (c) zona pelusida kambing. Keterangan : (1) sel-sel kumulus, (2) vitelus, (3) zona pelusida. Pemeriksaan pada pembesaran 200 x dengan Mikroskop Olympus CK2.

SDS-PAGE Protein gZP

Identifikasi konstituen-konstituen protein zona pelusida kambing dilakukan dengan *Sodium Dodecyl Sulphate - Polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) konsentrasi 12 % dalam *Electrophoresis set mini protein gel* (Bio-Rad). Sebagai marker digunakan *High Range SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad) dan pewarnaan hasilnya dengan *silver stain SDS-PAGE Standards* (Bio-Rad). Penelitian dilakukan di *Tropical Disease Center* (TDC) Universitas Airlangga.

Zona pelusida kambing dalam proses elektroforesisi dengan SDS-PAGE 12 % menghasilkan tiga *band*. Berdasarkan urutan massa molekul relatif (M_r) nya selanjutnya ketiga *band* tersebut berturut-turut disebut sebagai gZP1, gZP2

dan gZP3. *Band* pertama, gZP1 mempunyai kedudukan sedikit di atas marker β galactosidase (Mr 116,25), gZP2 berkedudukan sedikit di bawah *phosphorilase b* (Mr 97,40), sedangkan gZP3 berada di atas marker *Bovine serum albumin* (Mr 66,20). Gambaran gel hasil SDS-PAGE protein zona pelusida kambing dengan pewarnaan *silver stain* tampak pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Gel Hasil Analisis dengan SDS-PAGE 12 % pada Zona Pelusida Kambing dengan Pewarnaan *Silver Stain* (M : marker, 1, 2 dan 3 : sampel gZP)

Elusi Protein gZP3

Setiap kali isolasi protein, dipakai 10 μ l sampel suspensi protein zona pelusida kambing yang mengandung 84 μ g total protein per sumuran (*lane*) SDS-PAGE. Potongan *band* gZP3 hasil SDS-PAGE tanpa pewarnaan dimasukkan ke dalam kantong selofan untuk di-*running* dalam alat elektroforesis

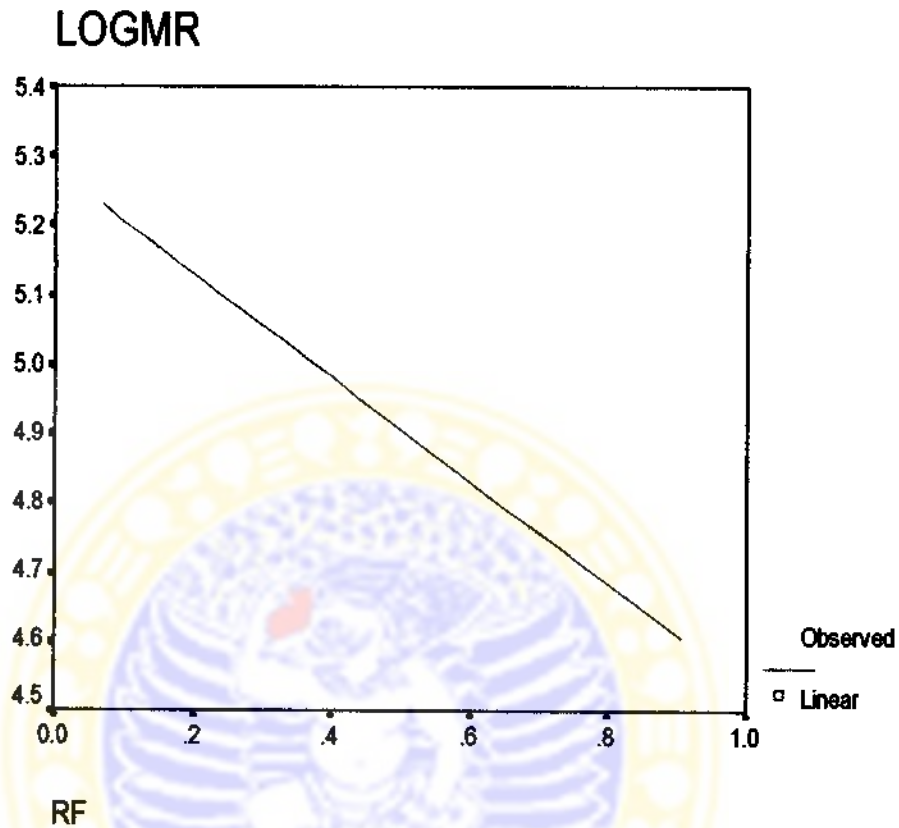
horizontal. Hasil isolasi protein band ketiga hasil SDS-PAGE pada penelitian ini diperoleh 9,5 ml suspensi protein gZP3 dengan konsentrasi 290,547 µg/ml.

5.1.2 Karakterisasi Sifat Immunogen Protein gZP3

a. Penghitungan Mr gZP3

Perhitungan massa molekul relatif (Mr) protein gZP3 dilakukan berdasarkan Manual *SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (Catalog Number 161-0317, Bio-Rad). Analisis regresi dilakukan dengan program aplikasi statistik : *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 10.5. Analisis regresi berdasarkan data jarak antar *band marker* pada gel hasil SDS-PAGE dan data Mr masing-masing *marker*, diperoleh persamaan regresi linier : $y = 5,272 - 0,705x$.

Plot kurva nilai logaritma Massa molekul relatif (LOGMR) protein marker *High Range Standard* terhadap mobilitas relatif molekul protein (RF) dalam SDS-PAGE 12 % sebagaimana dimaksud persamaan matematis di atas, tertera sebagai Gambar 5.3. Pada persamaan tersebut, nilai x adalah nilai *Relative mobility* (Rf) sampel, yaitu jarak migrasi sampel dibagi jarak migrasi pewarna, sedangkan nilai y adalah nilai logaritma Mr sampel yang dihitung (gZP1, gZP2 dan gZP3).



Gambar 5.3 Plot Kurva Nilai Logaritma Massa Molekul Relatif (LOGMR) Protein Marker *High Range Standard* terhadap Mobilitas Relatif Molekul Protein (RF) dalam SDS-PAGE 12 %.

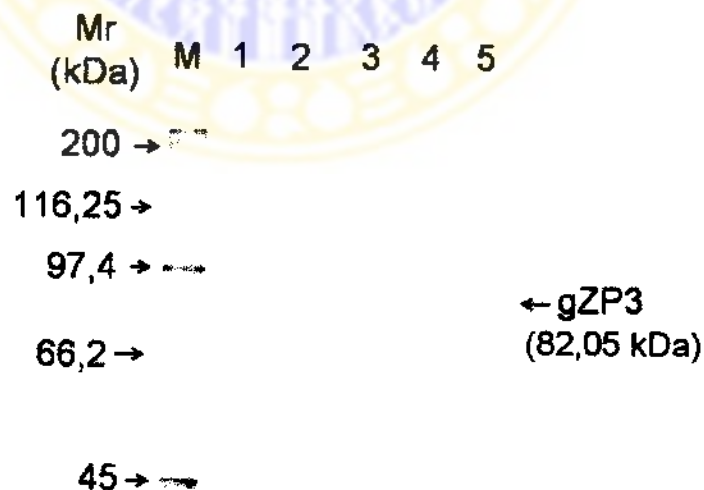
Perhitungan M_r masing-masing konstituen zona pelusida kambing dilakukan pada 5 *lane* ($n=5$) yang jelas terbaca pada gel hasil SDS-PAGE. Dengan menggunakan persamaan regresi tersebut di atas, dari lima *lane* yang dianalisis secara deskriptif didapat hasil sebagai berikut : M_r gZP1 adalah 120.67 ± 6.12 ; M_r gZP2 adalah 94.38 ± 1.66 dan M_r gZP3 sebesar 82.05 ± 6.90 kDa (Tabel 5.1, Lampiran 2).

Tabel 5.1. Statistik Deskriptif Massa Molekul Relatif (kDa) Konstituen Zona Pelusida Kambing Berdasarkan Migrasi Protein pada SDS-PAGE

Konstituen	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
gZP1	114,17 – 127,41	120,67 \pm 6,12
gZP2	93,02 – 97,09	94,38 \pm 1,66
gZP3	74,00 – 90,26	82,05 \pm 6,90

b. Analisis Isolat Protein gZP3 dengan SDS-PAGE

Sampel cairan hasil elusi dianalisis dengan SDS-PAGE untuk konfirmasi apakah protein yang diisolasi benar-benar berasal dari *band* ketiga gel hasil *running* sampel gZP (Gambar 5.4). Dari lima sampel, semuanya menghasilkan band tunggal yang terletak di bawah marker *posphorilase b* ($M_r = 97,4$ kDa).



Gambar 5.4 Analisis Isolasi Protein gZP3 dengan SDS-PAGE 12 % (M : marker ; 1, 2, 3, 4 dan 5 : sampel gZP3)

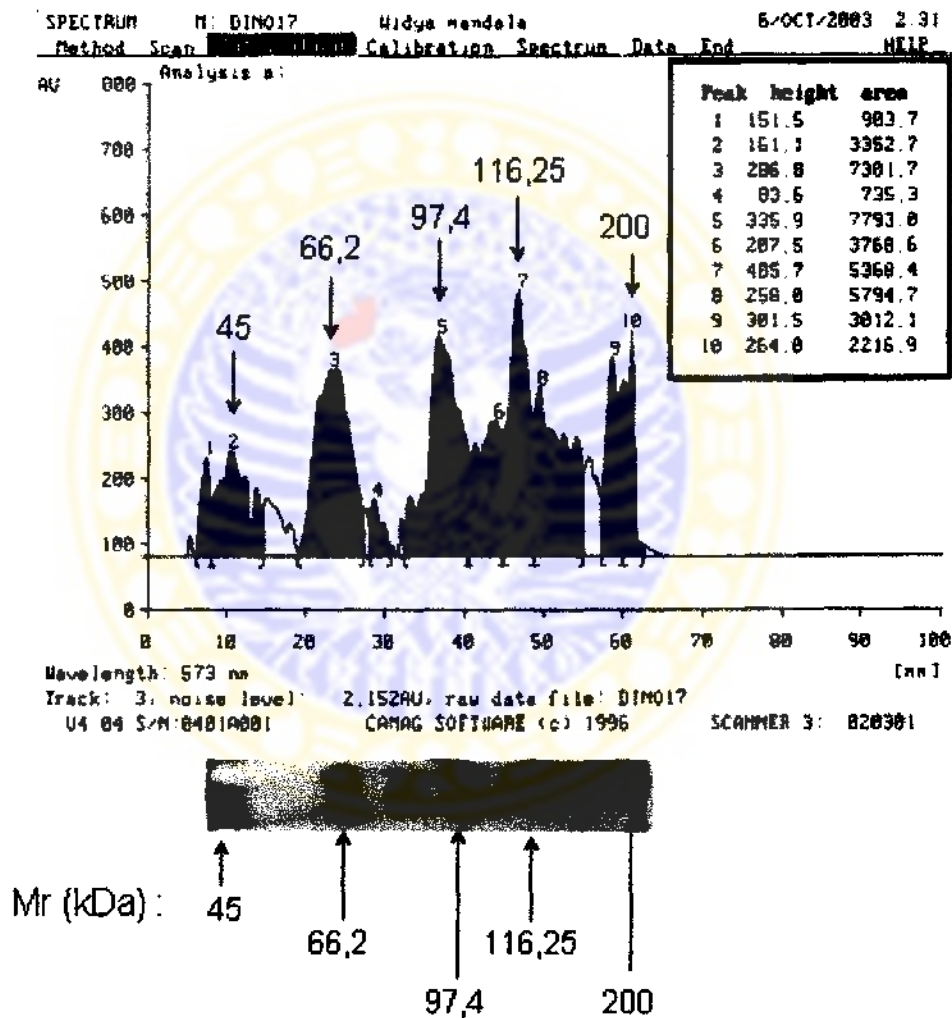
c. Densitometri Gel SDS-PAGE Protein gZP dan gZP3

Pada penelitian ini pemeriksaan gel hasil SDS-PAGE dengan densitometri dilakukan dengan tujuan untuk konfirmasi keberadaan *band* pada masing-masing *lane*, dan untuk menghitung proporsi protein dalam satu *lane*. Suatu *band* yang menandakan adanya akumulasi protein pada gel hasil elektroforesis diidentifikasi sebagai oleh suatu puncak (*peak*). Masing-masing puncak memiliki karakteristik ketinggian (*height*) sebagai intensitas densitograf dan luas daerah di bawah kurva (*area*) sebagai gambaran kuantitas protein pada *band* tersebut.

Dalam SDS-PAGE kuantitas bahan yang diidentifikasi Mr nya dapat diketahui berdasarkan tingkat ketebalan masing-masing *band*. Pada protein zona pelusida kambing (gZP) *band* paling tebal adalah *band* protein gZP3, kemudian diikuti gZP2 dan paling tipis gZP1.

Hasil pemeriksaan dengan Densitometri terhadap *lane marker*, *lane* gZP dan gZP3 dapat dilihat pada Gambar 5.5. Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa masing-masing *band* ditandai oleh ketinggian kurva (*hieght*) sebagai intensitas densitograf, sedangkan ketebalan *band* yang menggambarkan kuantitas protein pada *band* tersebut ditunjukkan oleh luas daerah di bawah kurva (*area*).

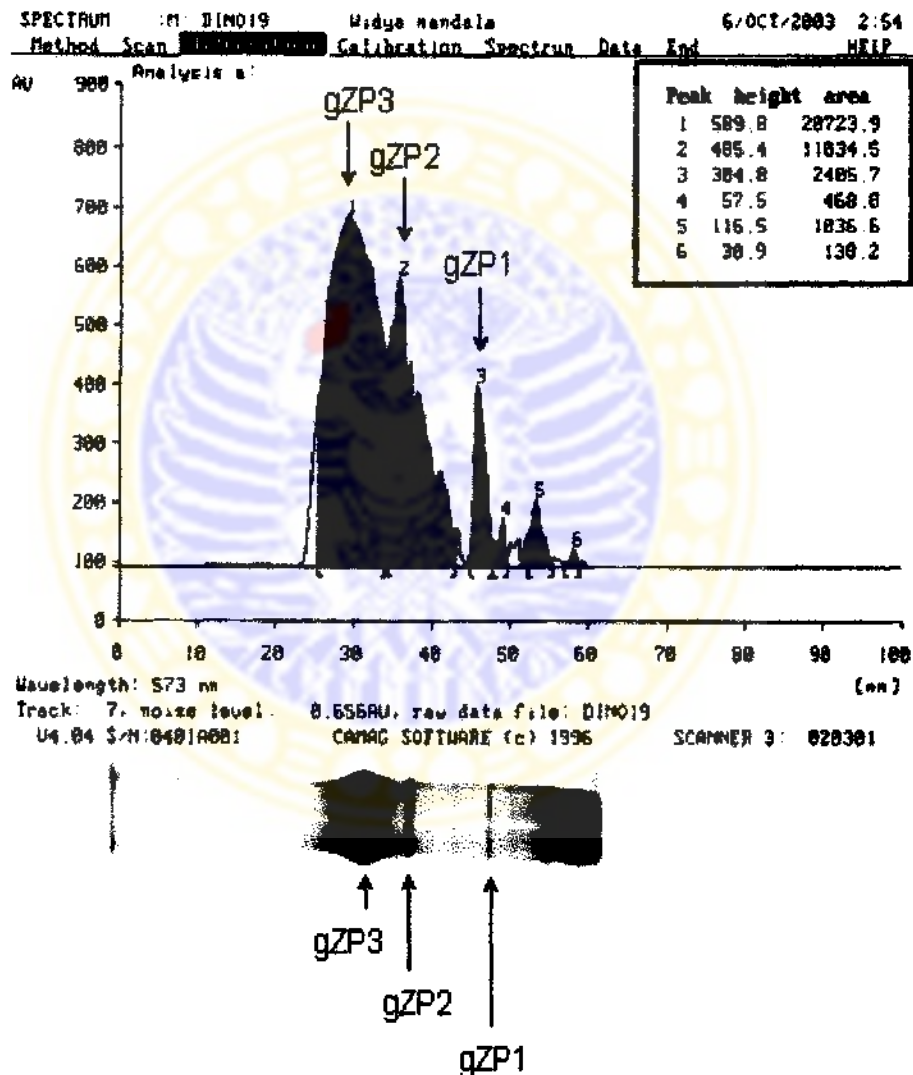
Pada kurva densitograf marker, Gambar 5.5 (a), muncul sepuluh puncak (*peak*) kurva, namun yang letaknya sesuai dengan lima *band* yang ada pada gel hasil SDS-PAGE adalah puncak nomor 2, 3, 5, 7 dan 9.



Gambar 5.5 (a) Analisis Marker Hasil SDS-PAGE dengan Densitometri pada Panjang Gelombang 573 nm

Pada kurva densitograf SDS-PAGE sampel gZP muncul enam puncak, sebagaimana Gambar 5.5 (b). Gambaran kurva

yang sesuai dengan *band* gZP1, gZP2 dan gZP3 adalah puncak densitograf nomor 3, 2 dan 1, sedangkan puncak 4, 5 dan 6 relatif sangat rendah. Diantara ketiga puncak tersebut, puncak nomor 1 (gZP3) paling dominan.



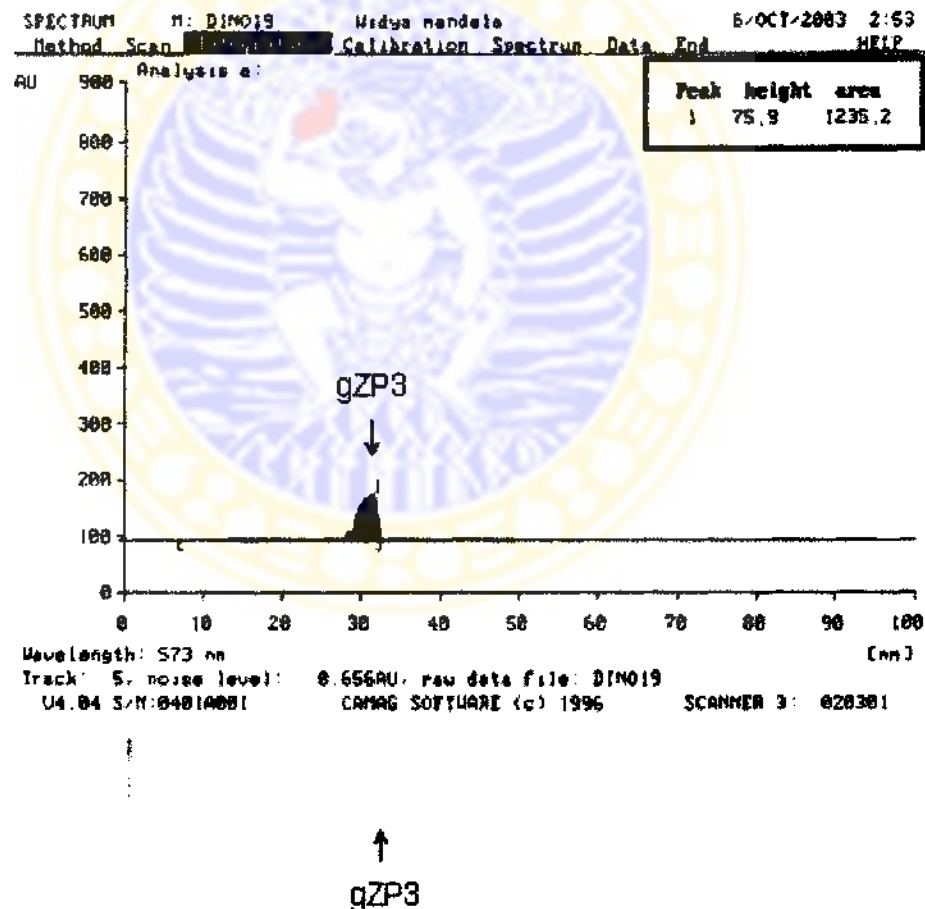
Gambar 5.5 (b) Analisis Protein gZP Hasil SDS-PAGE dengan Densitometri pada Panjang Gelombang 573 nm

Pada densitograf pada Gambar 5.5 (b) diatas, kurva gZP1 tampak langsing, sedangkan kurva densitograf gZP2 dan gZP3 saling tumpang tindih (*overlapping*). Namun pada gel ketiga konstituen tampak jelas terpisah. Pada penelitian ini didapat lima *lane* pada gel *SDS-PAGE* dengan tiga *band* konstituen zona pelusida yang jelas terbaca. Analisis densitometrik terhadap kelima *lane* tersebut menghasilkan nilai luas area di bawah kurva densitograf pada masing-masing komponen zona pelusida. Berdasarkan data tersebut selanjutnya dapat dihitung nilai rerata, standar deviasi dan persentase gZP1, gZP2 dan gZP3 sebagaimana Tabel 5.2 dan Lampiran 3. Dalam bentuk *Pie Diagram* proporsi persentase masing-masing konstituen zona pelusida kambing dapat dilihat pada Gambar 5.6 Dalam Angka persentase tersebut menggambarkan proporsi masing-masing konstituen.

Tabel 5.2. Rerata, Standar Deviasi dan Persentase Luas Daerah (mm^2) Di Bawah Kurva Densitograf Konstituen Zona Pelusida Kambing

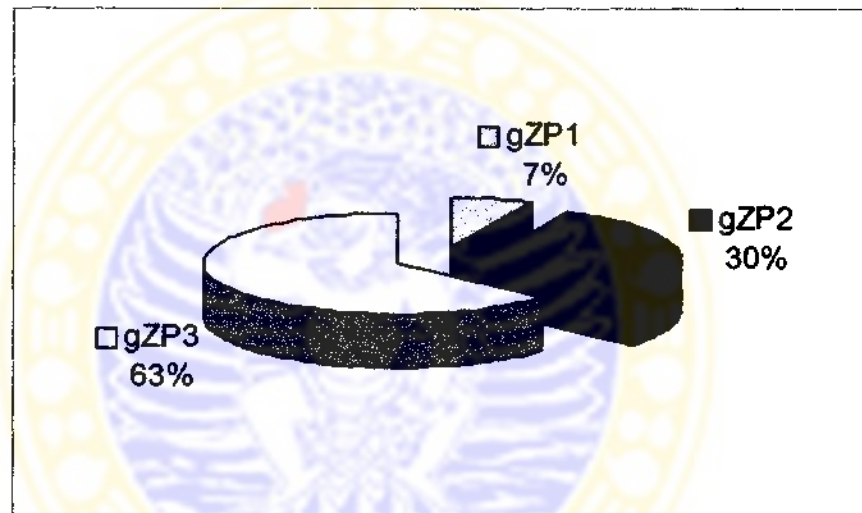
Konstituen	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku	Persentase
gZP1	2.089,2 – 3.092,1	2.505,88 \pm 418,84	6,93
gZP2	10.111,8 – 11.457,6	10.710,75 \pm 557,63	29,60
gZP3	20.723,9 – 24.305,0	22.963,45 \pm 1.346,50	63,47

Gambar 5.5 (c) memperlihatkan konfirmasi hasil elusi gZP3 dalam *running* ulang SDS-PAGE dengan densitografya. Sebanyak 10 μ l sampel hasil elusi (mengandung 2,9 μ g gZP3) diencerkan dalam *Laemli buffer* 1 : 1. Larutan tersebut selanjutnya dipaparkan pada sumuran SDS-PAGE 12 % sebagaimana proses identifikasi konstituen-konstituen zona pelusida sebelumnya.



Gambar 5.5 (c) Analisis Protein gZP3 Hasil SDS-PAGE Ulang Isolat gZP3 dengan Densitometri pada Panjang Gelombang 573 nm

Densitograf pada *lane* gel hasil SDS-PAGE ulang tersebut tampak sebagai kurva tunggal dengan jarak *peak* kurva 32 mm, tinggi kurva 75,9 mm dan luas daerah di bawah kurva 1235,2 mm². Jarak *peak* tersebut identik dengan jarak migrasi protein pada gel elektroforesis ulang suspensi isolat gZP3 (Lampiran 3).



Gambar 5.6 Diagram Persentase Proporsi Konstituen Protein Zona Pelusida Kambing Berdasarkan Densitometri Gel Hasil SDS-PAGE

d. Produksi Antibodi gZP3

Titer Antibodi gZP3 Asal Mencit (*Mus musculus*)

Menurut Lee dan Chi (1985), suatu bahan berpengaruh sebagai antifertilitas apabila menyebabkan angka infertilitas lebih dari 60 %. Penelitian *in vivo* pengaruh imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan protein gZP3 dalam *Freund Adjuvant*

telah dilakukan. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa dosis yang memenuhi kriteria tersebut adalah 20 dan 40 μg gZP3 yang menghasilkan angka infertilitas 80 % dan 100 % (Mustofa dkk, 2004a).

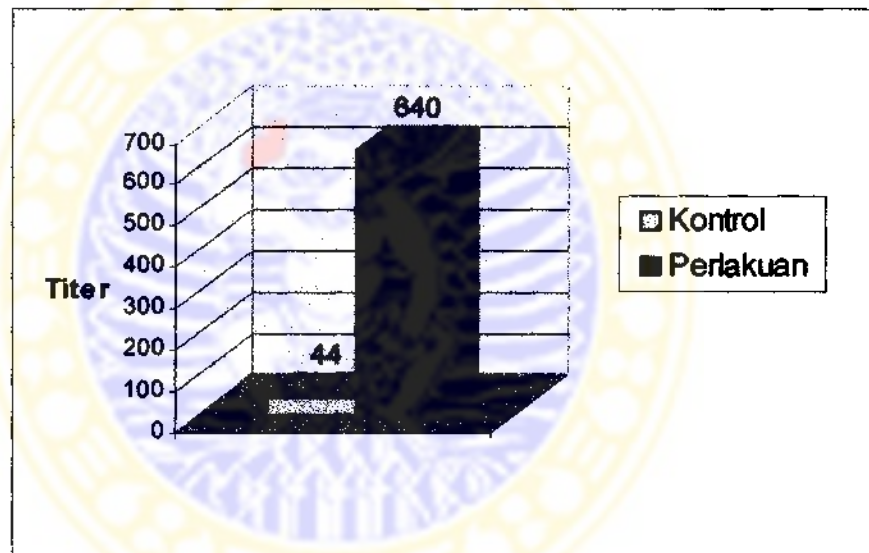
Sehubungan dengan hal tersebut di atas, maka untuk mendapatkan titer yang tinggi, pada penelitian ini imunisasi dilakukan juga dengan dosis 40 μg gZP3 dalam *Freund Adjuvant* dengan dua kali *booster* interval antar imunisasi selama 14 hari. Keberadaan antibodi pada serum hewan coba diperiksa dengan Elisa indirek. Titer antibodi Serum mencit (*Mus musculus*) kelompok perlakuan dibandingkan dengan titer antibodi serum mencit kelompok kontrol. Pada penelitian ini terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) titer antibodi dalam serum antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol (Lampiran 4, Tabel 5.3).

Tabel 5.3. Titer Antibodi Mencit (*Mus musculus*) setelah Imunisasi dengan gZP3

Perlakuan	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
Kontrol	40,00 – 80,00	44,00 \pm 12,65 ^{a)}
40 μg	640,00 – 640,00	640,00 \pm 0,00 ^{b)}

Superskrip yang tidak sama, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Kelompok perlakuan menghasilkan rerata titer antibodi sebesar $640,00 \pm 0,00$, enam belas kali lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yang menunjukkan adanya titer antibodi $44,00 \pm 12,65$. Dalam bentuk diagram batang perbedaan titer antibodi antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Titer Antibodi serum Mencit (*Mus musculus*) Kelompok Kontrol dan Perlakuan Imunisasi dengan 40μ gZP3

Titer Antibodi gZP3 Asal Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Titer antibodi pada serum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara sebelum imunisasi dengan setelah imunisasi (Lampiran 5, Tabel 5.4, Gambar 5.8).

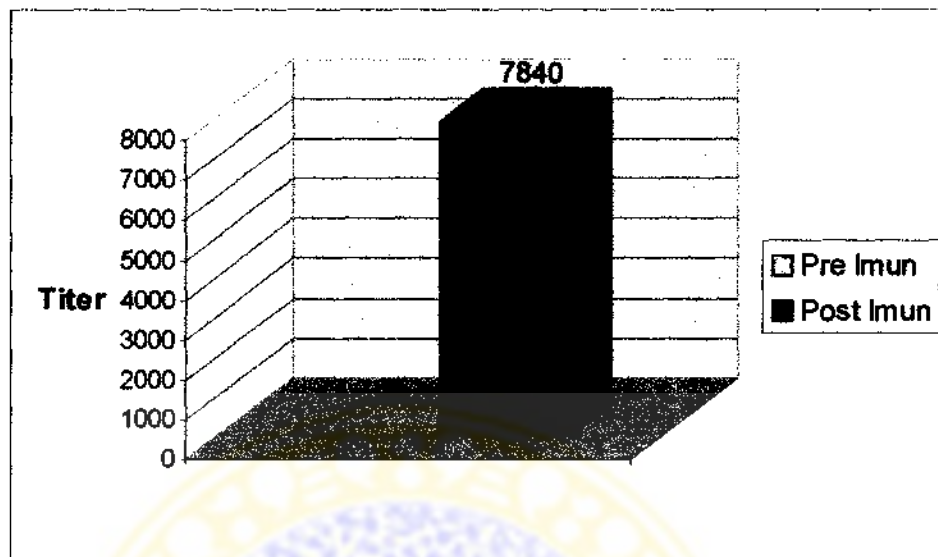
Tabel 5.4 Titer antibodi kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3.

Perlakuan	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
Sebelum Imunisasi	0 - 0	0 \pm 0 ^{a)}
Setelah Imunisasi	2560 - 10240	7840 \pm 2876,44 ^{b)}

Superskrip yang tidak sama dalam satu kolom, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Pada penelitian ini digunakan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan untuk memproduksi antibodi gZP3 dalam jumlah yang mencukupi untuk penelitian fertilisasi *in vitro* antara oosit dan spermatozoa kambing. Hasil penelitian menunjukkan bahwa serum hewan coba sebelum imunisasi, sama sekali tidak mengandung antibodi yang dapat dikenali oleh gZP3. Setelah imunisasi dengan 200 μg gZP3, terdapat antibodi dengan rerata 7840 \pm 1538.92.

Serum yang diperoleh dari hewan coba yang telah diimunisasi tersebut selanjutnya dipakai pada penelitian berikutnya. Serum disuplementasikan ke dalam media maturasi oosit kambing untuk mengamati kemampuannya dalam menghambat pembentukan *cleavage* pada fertilisasi *in vitro*, dibandingkan kontrol dan perlakuan suplementasi gZP3 pada media kapasitas spermatozoa.



Gambar 5.8 Rerata titer antibodi Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan sebelum (Pre Immun) dan setelah imunisasi (Post Immun) dengan gZP3

e. Analisis Dot Blot

Analisis *Dot blot* dilakukan untuk memastikan bahwa antibodi yang ada pada serum mencit (*Mus musculus*) dan kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) hasil imunisasi hewan coba dengan protein gZP3 adalah benar-benar spesifik antibodi gZP3. Hasil analisis tersebut selanjutnya dipakai sebagai dasar penelitian berikutnya.

Hasil uji spesifisitas dengan metode *Dot blot* ditampilkan sebagai Gambar 5.9. Pengenalan antibodi gZP3 dengan protein gZP3 ditandai dengan noda berwarna abu-abu keunguan (warna *Western blue* yang dipakai pada penelitian ini). Pada gambar tersebut menunjukkan bahwa antibodi gZP3 yang berasal dari

serum mencit (*Mus musculus*) (kolom M) maupun asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) (kolom R) sebagai perlakuan (sub kolom P) dapat mengenali protein gZP3. Pada kontrol (sub kolom K) masing-masing spesies tidak menunjukkan adanya pengenalan antigen-antibodi.

		M			
		AbgZP3 : 1/25		AbgZP3 : 1/50	
		P	K	P	K
150 ng gZP3		●			
120 ng gZP3		●			
90 ng gZP3		●			
60 ng gZP3		●			

		R			
		AbgZP3 : 1/25		AbgZP3 : 1/50	
		P	K	P	K
150 ng gZP3					
120 ng gZP3					
90 ng gZP3					
60 ng gZP3					

Gambar 5.9 Hasil Analisis Dot Blot Antibodi gZP3 (AbgZP3) Asal Mencit (*Mus musculus*) (Kolom M) dan Serum Asal Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) (Kolom R) terhadap Protein gZP3. K : Kontrol, P : Perlakuan.

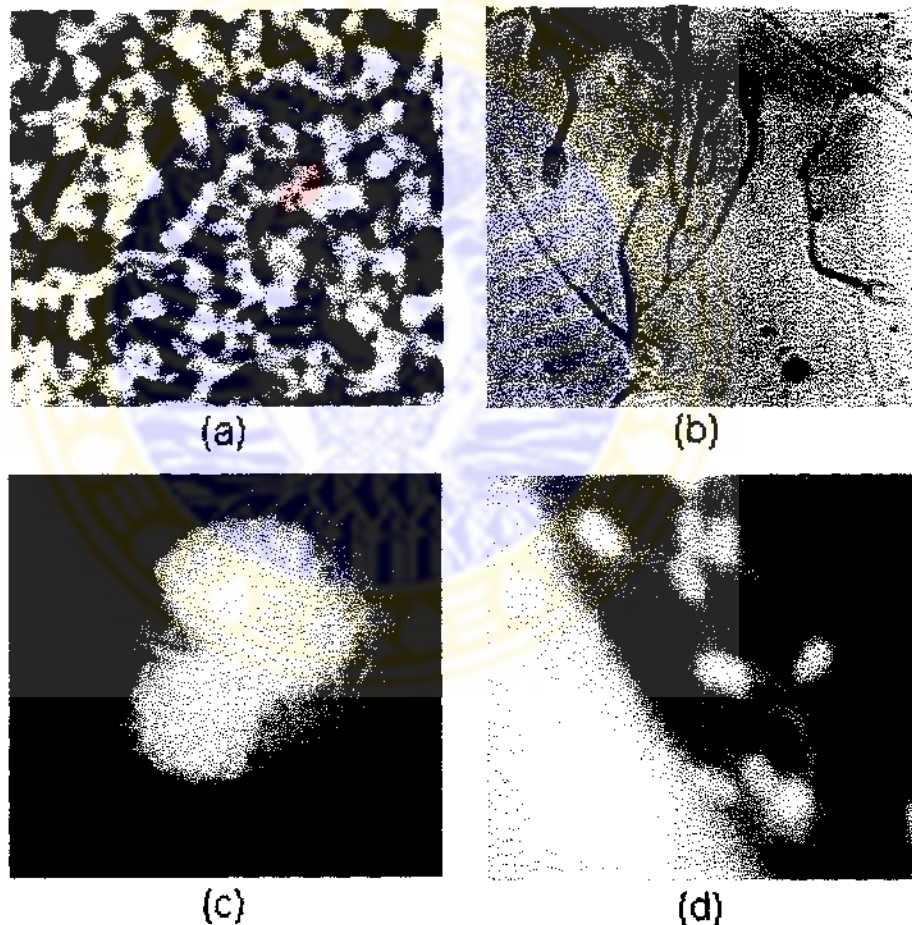
Gradasi warna pada noda dipengaruhi oleh variasi konsentrasi antigen protein gZP3, pengenceran antibodi gZP3 dan spesies asal antibodi. Konsentrasi antigen protein gZP3 dan antibodi gZP3 yang lebih kecil menghasilkan gradasi warna lebih terang, demikian pula sebaliknya. Gradasi warna hasil *Dot blott* serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) pada pengenceran dan kadar protein gZP3 yang sama nampak lebih terang dibandingkan dengan serum mencit (*Mus musculus*).

f. Uji Imunofluoresen

Uji imunofluoresen dilakukan untuk konfirmasi bahwa isolat yang diperoleh benar-benar gZP3, reseptor primer pada zona pelusida yang berperan pada pengenalan spermatozoa kambing. Isolat protein gZP3 disimpulkan sebagai reseptor pengenalan spermatozoa kambing, apabila terdapat fluoresensi pada wilayah kepala spermatozoa setelah preparat ulas spermatozoa kambing dipapar berturut-turut dengan protein gZP3, antibodi gZP3 (antibodi primer) dan *Conjugate Rabbit anti mice IgG* (antibodi sekunder).

Uji imunofluoresen pada penelitian ini pertama-tama dilakukan untuk mendeteksi pengenalan antibodi gZP3 terhadap zona pelusida kambing, dilanjutkan identifikasi pengenalan protein gZP3 terhadap spermatozoa kambing. Visualisasi adanya

reaksi positif diidentifikasi berdasarkan antibodi sekunder, yaitu *Conjugate Rabbit anti mice IgG* terlabel *Fluoro iso thio cyanate* (FITC) (Gambar 5.10). Reaksi positif ditandai dengan terjadinya fluoresensi preparat (preparat berpendar dengan warna kuning kehijauan) pada pemeriksaan dengan menggunakan mikroskop ultra violet atau mikroskop fluoresen.



Gambar 5.10 Analisis Imuno Fluoresen Natif gZP3 : (a) sonikasi zona pelusida kambing dan (b) spermatozoa kambing tidak berfluoresensi (kontrol); (c) sonikasi zona pelusida kambing dan (d) spermatozoa kambing berfluoresensi. Pemeriksaan dengan Mikroskop Ultra Violet pada Pembesaran 400 x

Zona pelusida kambing pada preparat kontrol tidak menunjukkan adanya fluoresensi. Tanpa keberadaan antibodi gZP3, antibodi sekunder (*Conjugate Rabbit anti mice IgG*, yang terlabel *Fluoro isothiocyanate*, FITC) tidak dapat mengenali preparat ulas zona pelusida kambing, sebagaimana dibuktikan pada Gambar 5.10 (a).

Preparat ulas hasil sonikasi zona pelusida kambing, setelah dipapar berturut-turut dengan antibodi gZP3, dan antibodi sekunder terlabel FITC, ternyata menghasilkan adanya fluoresensi dalam pemeriksaan menggunakan mikroskop fluoresen sebagaimana terlihat pada Gambar 5.10 (c).

Preparat ulas spermatozoa kambing tanpa adanya gZP3 tidak menunjukkan adanya fluoresensi meskipun sebelumnya dipapar secara berurutan : antibodi gZP3, dan antibodi sekunder (*Conjugate Rabbit anti mice IgG*, terlabel *Fluoro iso thio cyanate*, FITC), sebagaimana Gambar 5.10 (b).

Preparat ulas spermatozoa kambing yang dipapar berturut-turut dengan gZP3, antibodi gZP3, dan antibodi sekunder, ternyata menghasilkan fluoresensi pada bagian membran plasma kepala spermatozoa, sebagaimana Gambar 5.10 (d). Hal ini menunjukkan bahwa protein gZP3 mengenali membran plasma spermatozoa kambing.

5.2 Penelitian II :

Uji Binding Antibodi dan Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing (gZP3) dengan Teknik Fertilisasi *in vitro*

Pada penelitian ini pengujian terhadap peran gZP3 dalam fertilisasi dilakukan secara resiprok pada oosit dan spermatozoa kambing dengan teknik fertilisasi *in vitro*. Oosit kambing diberi perlakuan dengan antibodi gZP3 asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan (dari hasil penelitian I) pada tahap maturasi oosit. Setelah oosit tersebut matang dilanjutkan dengan inseminasi *in vitro* menggunakan spermatozoa kambing dengan perlakuan proses kapasitasi standar. Sebaliknya spermatozoa kambing diberi perlakuan dengan protein gZP3 pada tahap kapasitasi, selanjutnya dipakai untuk menginseminasi *in vitro* pada oosit kambing yang mengalami perlakuan maturasi standar. Sebagai kontrol dipergunakan oosit kambing dengan perlakuan maturasi standar dan spermatozoa kambing dengan perlakuan standar, kemudian keduanya diproses lebih lanjut dalam inseminasi *in vitro*.

Protein gZP3 disimpulkan berperan sebagai reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing, apabila pembuahan tidak terjadi pada kedua kelompok perlakuan oosit maupun spermatozoa kambing. Tolok ukur untuk menentukan kegagalan pembuahan adalah berdasarkan penurunan angka *cleavage* hasil fertilisasi *in vitro* secara nyata pada taraf kepercayaan 5 %. Hasil penelitian

disajikan pada Lampiran 6, Tabel 5.5 dan Gambar 5.11. Visualisasi oosit matang dan embrio stadium *cleavage* terdapat pada Gambar 5.12.

Tabel 5.5. Angka *Cleavage* embrio kambing (%) setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit dan penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa

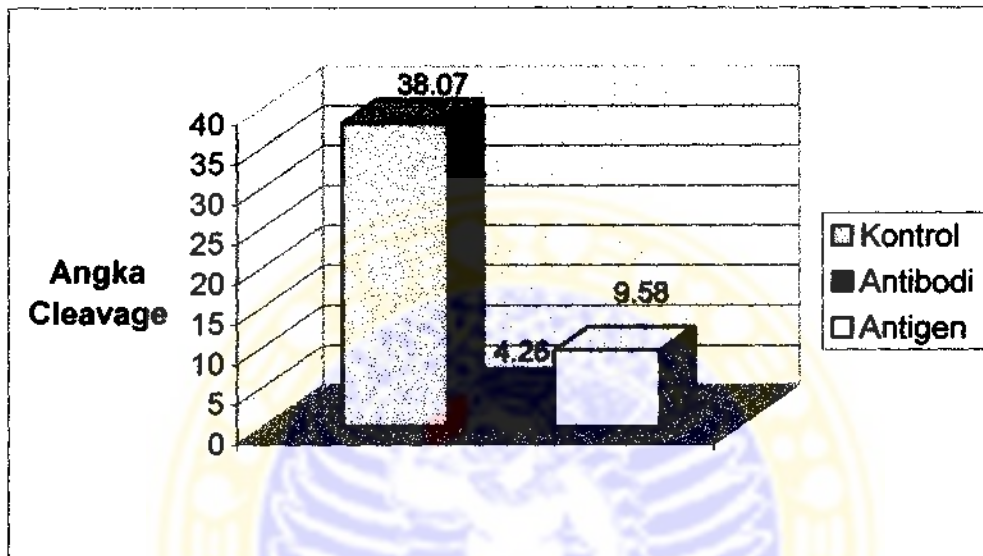
Perlakuan	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
Kontrol	27,27 – 45,45	38,07 \pm 5,23 ^{a)}
Antibodi gZP3 pada Maturasi Oosit	0,00 – 9,09	4,26 \pm 3,78 ^{b)}
GZP3 pada Kapasitas Spermatozoa	0,00 – 20,00	9,58 \pm 6,70 ^{c)}

Superskrip yang tidak sama dalam satu kolom, berbeda nyata ($p < 0,05$).

Pada penelitian ini kinerja antibodi gZP3 maupun protein gZP3 dalam menghambat terjadinya fertilisasi antara oosit dengan spermatozoa kambing diamati berdasarkan besarnya angka *cleavage* yang terjadi setelah perlakuan. Angka *cleavage* adalah besarnya persentase embrio stadium *cleavage* yang berkembang setelah fertilisasi *in vitro*. Embrio stadium *cleavage* adalah sigot hasil fertilisasi *in vitro* yang selanjutnya mengalami mitosis beberapa kali, sehingga terbentuk beberapa (2 – 32) sel blastomer tanpa disertai penambahan volume embrio (Gordon, 1994 ; Bongso dan Gardner, 2000).

Berdasarkan data tersebut di atas terlihat bahwa terjadi penurunan angka *cleavage* kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Pada kelompok kontrol (perlakuan standar fertilisasi *in vitro* pada oosit dan spermatozoa

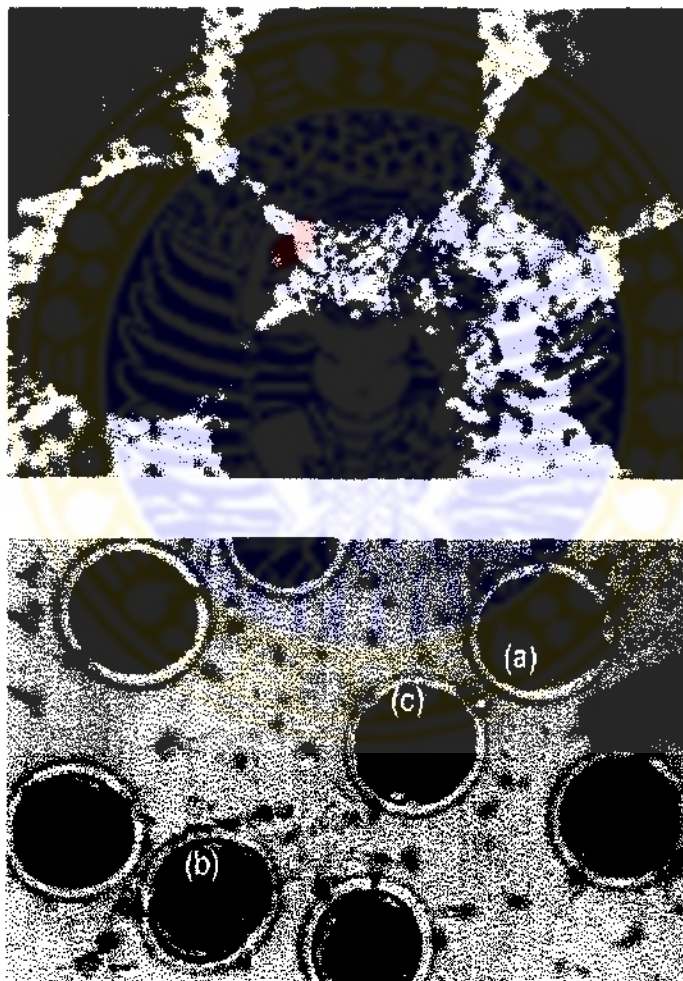
kambing) angka *cleavage* berkisar dalam rentangan data 27,27 – 45,45 % dengan rerata $38,07 \pm 5,23$ %.



Gambar 5.11 Hasil Fertilisasi *in vitro* pada Kambing setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit (Antibodi) dan penambahan gZP3 pada media kapasitas spermatozoa (Antigen).

Pada kelompok perlakuan suplementasi 10 % serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang mengandung antibodi gZP3 dengan titer 10.240 pada media maturasi oosit kambing, angka *cleavage* dengan rentangan antara 0,00 – 9,09 dengan rerata $4,26 \pm 3,78$ %. Angka *cleavage* kelompok perlakuan oosit kambing dengan antibodi gZP3 tersebut lebih rendah ($p < 0,05$) menjadi satu per sembilan dibandingkan kelompok kontrol. Sedangkan pada kelompok perlakuan suplementasi 10 % atau $13,16 \mu\text{g} / \text{ml}$ protein gZP3 pada media kapasitas

spermatozoa (media EBSS), angka *cleavage* lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol, yaitu dengan rentangan antara 0,00 – 20,00 dengan rerata $9,58 \pm 6,70$ %. Angka *cleavage* kelompok perlakuan spermatozoa kambing dengan protein gZP3 tersebut lebih rendah menjadi satu per empat dibandingkan kelompok kontrol.



Gamba 5.12 Fertilisasi *in vitro* oosit kambing (*Capra hircus*). Gambar atas : oosit yang telah matang, Gambar bawah : embrio stadium *cleavage*, (a) dua sel (b) empat sel (c) delapan sel. Pemeriksaan dengan Mikroskop Cahaya, Olympus CK2, pada pembesaran 100x.

5.3 Penelitian III :

A Uji Potensi Immunokontraseptif Antibodi gZP3 dengan Teknik Fertilisasi *in vitro* pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

Penelitian tahap ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh antibodi gZP3 asal serum mencit (*Mus musculus*) yang telah diimunisasi dengan gZP3 (*post immune serum*) terhadap kegagalan fertilisasi *in vitro* oosit dengan spermatozoa mencit dibandingkan dengan serum asal hewan coba yang sama sebelum imunisasi (*pre immune serum*).

5.3.1 Titer Antibodi gZP3 Sebelum dan Setelah Imunisasi

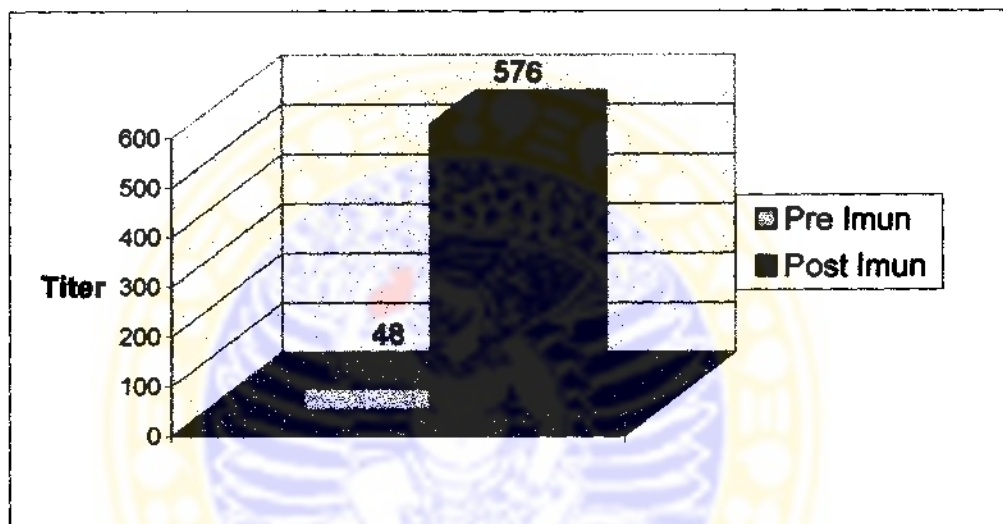
Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) titer antibodi gZP3 serum sebelum imunisasi (*pre immune serum*) dan setelah penyuntikan imunisasi (*post immune serum*), yaitu tujuh hari setelah *booster* kedua (Tabel 5.6, Gambar 5.13 dan Lampiran 7).

Tabel 5.6 Titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing.

Waktu	Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
Sebelum Imunisasi	40 – 80	48 \pm 16,87 ^{a)}
Setelah Imunisasi	320 – 640	576 \pm 134,92 ^{b)}

Superskrip yang tidak sama dalam satu kolom berbeda nyata ($p < 0,05$).

Serum yang berasal dari mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi tersebut di atas, selanjutnya digunakan untuk penelitian suplementasi media fertilisasi *in vitro* antara oosit dengan spermatozoa mencit.



Gambar 5.13 Titer Antibodi Serum Mencit (*Mus musculus*) Sebelum dan Setelah Penyuntikan dengan Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3)

5.3.2 Hasil Fertilisasi *in vitro* Mencit (*Mus musculus*)

Uji fertilisasi *in vitro* dilakukan terhadap antiserum Mencit (*Mus musculus*) sesudah imunisasi dengan 40 µg gZP3 (*post immune serum*) sebagai perlakuan dibandingkan dengan serum sebelum imunisasi (*pre immune serum*) sebagai kontrol. Kelompok perlakuan menggunakan *pre immune serum* yang mengandung antibodi dengan titer terendah, yaitu 40, sedangkan kelompok kontrol menggunakan

post immune serum dengan titer antibodi tertinggi, yaitu 640. Uji ini dimaksudkan untuk mendapatkan konfirmasi bahwa penyebab infertilitas pada hewan coba adalah antibodi gZP3 yang terdapat dalam serum.

Pada penelitian ini dua dari 10 hewan coba yang disuperovulasi tidak menghasilkan oosit sama sekali, sehingga terdapat delapan tetes fertilisasi sebagai ulangan (Tabel 5.7. dan Lampiran 8). Hasil penelitian dalam visualisasi gambar kantung oosit, kompleks oosit-kumulus, oosit yang telah mengalami fertilisasi dan oosit yang gagal fertilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.14.

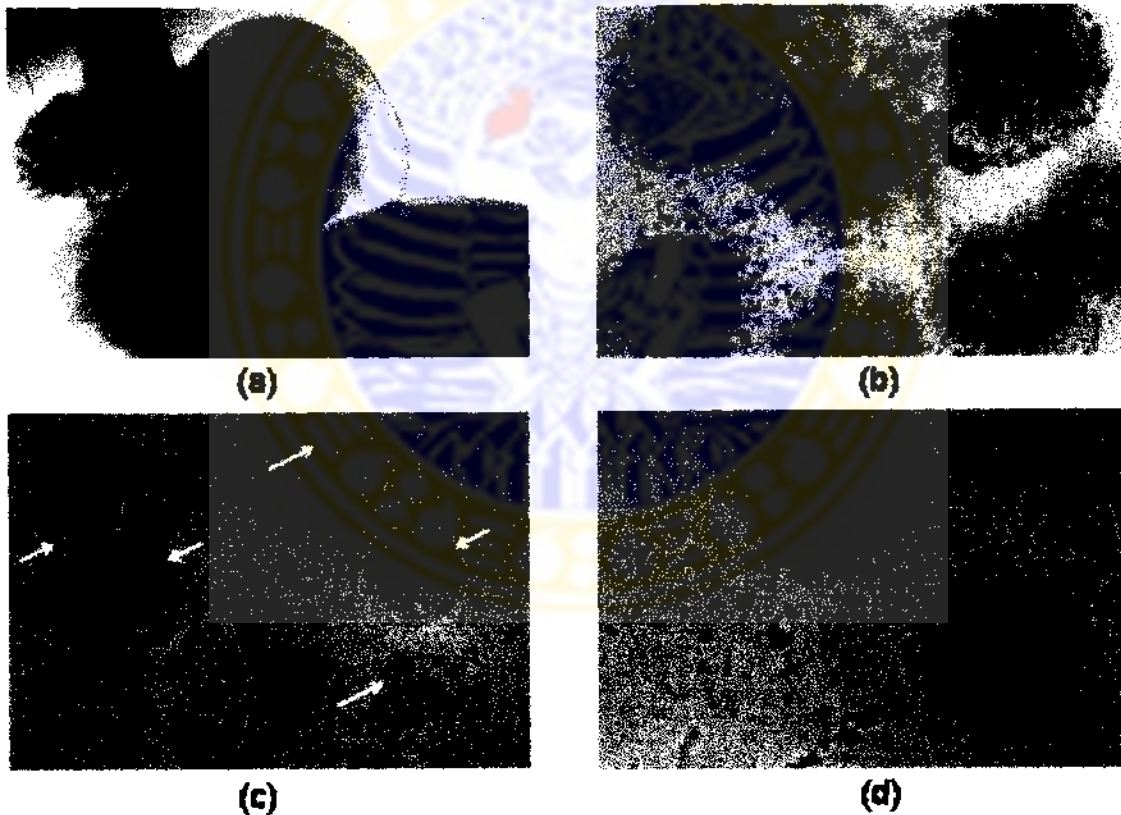
Tabel 5.7. Ringkasan data hasil fertilisasi *in vitro* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune serum* (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

Kelompok	Jumlah Tetes Fertilisasi	Jumlah Oosit	Fertilisasi	Gagal Fertilisasi
Kontrol	8	54	54	0
Perlakuan	8	49	0	49

Keterangan : terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antar perlakuan

Hasil pembedahan mencit (*Mus musculus*) betina untuk koleksi oosit menghasilkan delapan pasang kantung oosit. Kantung oosit berada pada oviduk, menggelembung berisi cairan, sehingga lebih transparan dibandingkan bagian oviduk yang lain, sebagaimana

terlihat pada Gambar (5.14a). Selanjutnya dengan bantuan mini pinset dan jarum tuberkulin, kantung oosit dibuka dengan pengamatan pada mikroskop disekting dengan pembesaran 40 kali. Keberadaan oosit matang mencit dengan kualitas A (sel-sel kumulus mekar, mengalami musinasi, terdiri lebih dari lima lapis sel) dapat dilihat pada Gambar (5.14.b).



Gambar 5.14. Hasil fertilisasi *in vitro* oosit mencit (*Mus musculus*) : (a), Kantung oosit, pembesaran 40 x (b), Komplek oosit – kumulus, (c) Oosit kelompok kontrol mengalami fertilisasi, tanda panah : Polar Body II ; dan (d) Oosit kelompok perlakuan tidak mengalami fertilisasi, pembesaran 100 x. Pemeriksaan dengan Mikroskop Cahaya Meiji CE Binocular

Spermatozoa motil dikoleksi dengan cara pembedahan dari kauda epididimis mencit (*Mus musculus*) jantan dewasa normal yang terbukti fertil. Kauda epididimis hewan coba diangkat, kemudian dicuci tiga kali dalam PBS selanjutnya dimasukkan ke dalam 0,5 ml media M16. Konsentrasi spermatozoa satu juta per 100 μ l media, dengan motilitas 100 % dipakai untuk fertilisasi *in vitro*.

Pada kelompok kontrol, media M16 disuplementasi sebanyak 10 % dengan *pre immune serum* dengan titer antibodi terendah, yaitu 40. Delapan tetes fertilisasi kelompok kontrol dengan total jumlah oosit sebanyak 54 buah, seluruhnya mengalami fertilisasi. Terjadinya fertilisasi ditandai dengan terdegradasinya sel-sel kumulus dan terbentuknya *polar body* // pada sigot sebagaimana terlihat pada Gambar 5.14 (c).

Pada kelompok perlakuan, media fertilisasi *in vitro* (M16) disuplementasi dengan antiserum (*post immune serum* dengan titer antibodi gZP3 640) sebesar 10 %. Hasil penelitian pada kelompok perlakuan ternyata menunjukkan bahwa antibodi gZP3 menghambat fertilisasi seluruh oosit pada delapan tetes fertilisasi dengan jumlah total oosit sebanyak 49 buah. Kegagalan fertilisasi tersebut ditandai dengan tetap intak atau tidak adanya perubahan pada seluruh Kompleks – Oosit – Kumulus (Gambar 5.14.d).

B Uji Potensi Imunokontraseptif Antibodi gZP3 dengan Teknik *Binding Assay* pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

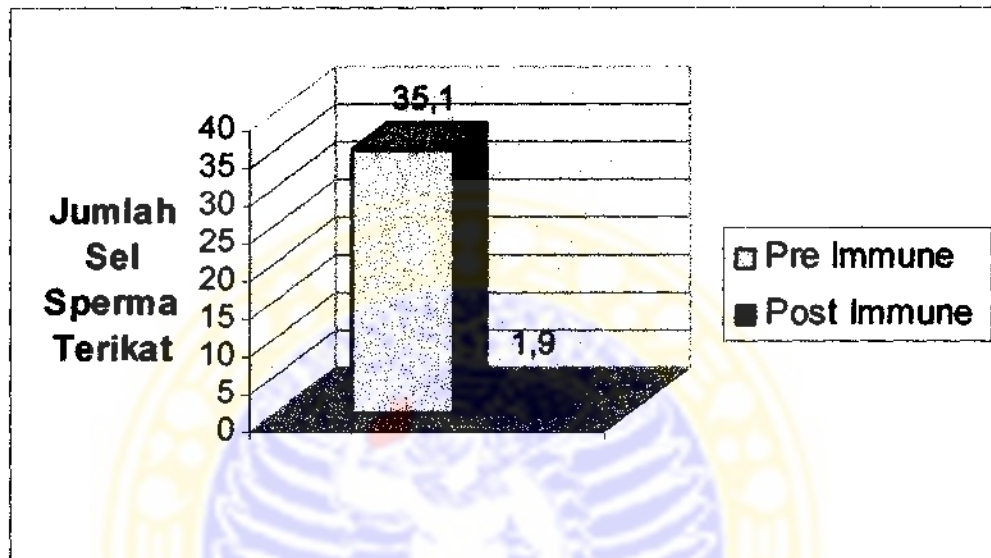
Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah spermatozoa yang terikat kuat pada zona pelusida kelompok perlakuan jauh lebih kecil ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol, sehingga *Binding Index* sebesar $5,45 \pm 3,88$ (skala 0 – 100) (Tabel 5.8, Gambar 5.15, dan Lampiran 9).

Tabel 5.8 Ringkasan data hasil *Binding Assay* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam serum *pre immune* dan serum *post immune*

Perlakuan	N	Jumlah Spermatozoa Terikat	
		Rentangan	Rerata \pm Simpangan Baku
Serum <i>Pre Immune</i>	10	33 – 43	$35,1 \pm 3,35$
Serum <i>Post Immune</i>	10	0 – 4	$1,90 \pm 1,25$
<i>Binding Index</i>	10	0,00 – 11,76	$5,45 \pm 3,88$

Pada penelitian ini serum yang dipakai adalah sama dengan serum pada pengujian dengan teknik fertilisasi *in vitro* di atas. Serum untuk kelompok perlakuan mengandung antibodi gZP3 dengan titer 640, hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan 40 μ g gZP3 dalam *Freund Adjuvant* dengan dua kali *booster* interval 14 hari. Serum untuk

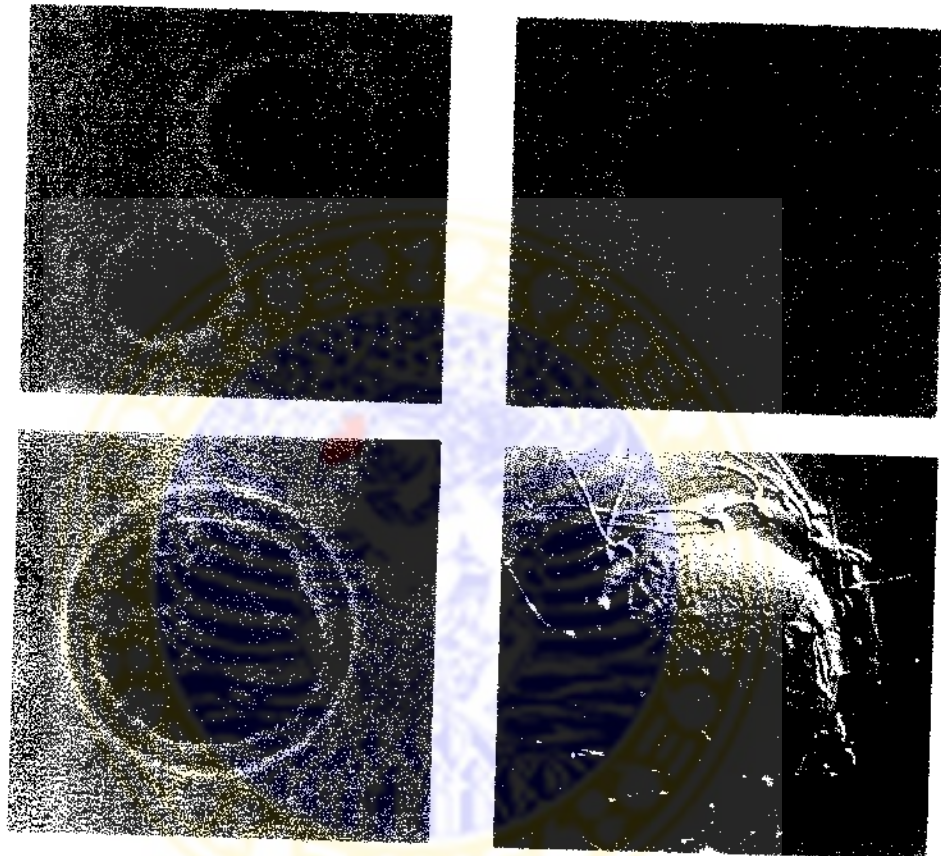
kelompok kontrol berasal dari hewan coba yang sama sebelum diimunisasi dengan gZP3, mengandung titer antibodi 40.



Gambar 5.15 Hasil *Binding Assay* pada Oosit Mencit dengan inkubasi dalam serum *pre immune* (Kontrol) dan serum *post immune* (Perlakuan)

Pada Gambar 5.16 (a), 5.16 (b), dan 5.16 (c) dapat dilihat hasil *Binding Assay* pada penelitian ini. Oosit mencit (*Mus musculus*) sebelum inkubasi dengan suspensi spermatozoa pada Gambar 5.16 (a). Pada kelompok kontrol terdapat bayangan gambar spermatozoa yang melekat di sekitar zona pelusida mencit (*Mus musculus*), Gambar 5.16 (b). Pada kelompok perlakuan diperlihatkan oosit yang tidak mengikat spermatozoa sama sekali, pada 5.16 (c). Gambar 5.16 (d)

adalah visualisasi *Binding Assay* tanpa perlakuan yang dikutip dari referensi (Wassarman *et al*, 2001).



Gamba 5.16 Gambaran *Binding Assay* oosit mencit (*Mus musculus*) : (a) Oosit sebelum perlakuan, (b) Oosit kontrol, tanda panah : gambaran spermatozoa, (c) Oosit kelompok perlakuan. Pemeriksaan dengan Mikroskop Cahaya Meiji CE Binocular pada Pembesaran 100 x Gambar (d) *Binding* spermatozoa dengan zona pelusida (Wassarman *et al*, 2001)

BAB 6 PEMBAHASAN

6.1. Identifikasi, Isolasi dan Karakterisasi Protein Reseptor Fertilisasi pada Zona Pelusida Kambing

Zona pelusida adalah glikoprotein berbentuk speris yang membungkus oosit. Pada fertilisasi, zona pelusida berfungsi sebagai tempat pengenalan dan perlekatan antara spermatozoa dengan ovum yang bersifat spesies spesifik, menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa, dan mencegah polispemi setelah fertilisasi (Hafez dan Hafez, 2000 ; Hemachand *et al*, 2002).

Zona pelusida disintesis selama pertumbuhan oosit pada folikulogenesis, dari fase *Germinal vesicle break down* (GVBD) sampai dengan fase metafase I. Pada masa tersebut oosit mensekresikan molekul-molekul proteoglikan membentuk zona pelusida berupa filamen-filamen panjang yang saling berkoneksi menyusun suatu struktur yang relatif porus. Pada metafase I dan metafase II zona pelusida sudah dapat dipenetrasi oleh spermatozoa karena adanya pori-pori proteoglikan (Pineda, 2003 ; Hafez dan Hafez, 2000).

Pengukuran mikrobiometri oosit kambing menunjukkan bahwa rerata diameter luar oosit adalah sebesar $183,89 \pm 12,95 \mu\text{m}$, diameter ooplasma (vitelus) sebesar $147,84 \pm 12,00 \mu\text{m}$. Sebagai perbandingan, oosit mencit mempunyai diameter sekitar $120 \mu\text{m}$ (Schorderet-Slatkine dan Huarte, 2003). Pada sapi, oosit mempunyai diameter luar $150,47 \pm 3,95$ dan diameter dalam $111,71 \pm 3,12$. Tebal zona pelusida kambing adalah sebesar $16,63 \pm 1,71 \mu\text{m}$.

Tebal zona pelusida sangat bervariasi pada beberapa spesies, yaitu ZP Opossum setebal 1 μm , mencit 5 μm , hamster 8 μm , manusia 13 μm , domba 15 μm , babi 16 μm dan sapi 27 μm (Hafez dan Hafez, 2000). Berdasarkan diameter terluar oosit dan tebal zona pelusida dapat dihitung volume tiap satuan zona pelusida kambing, yaitu dengan mengurangi volume bola berdasarkan diameter luar oosit dengan volume bola berdasarkan diameter bagian dalam zona pelusida, yang ternyata sebesar $849.354,13 \pm 218.315,6 \mu\text{m}^3$.

Pada SDS-PAGE protein mengalami elektroforesis dalam deterjen ionik, sehingga deterjen akan mengikat residu hidrofobik peptida. Protein dalam SDS-PAGE akan bermigrasi sesuai dengan massa molekul relatifnya dan akan terkonsentrasi pada *band* atau pita pada gel. Protein dengan massa molekul relatif (M_r) yang lebih besar pada gel SDS-PAGE akan tertahan pada posisi yang lebih tinggi daripada protein dengan massa molekul relatif yang lebih rendah (Rantam, 2003).

Apabila glikoprotein zona pelusida dipaparkan pada SDS-PAGE, maka pada umumnya akan terbagi dalam tiga macam protein konstituen (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000 ; Rankin dan Dean, 2000 ; Srivastava *et al*, 2002 ; Miller *et al*, 2000). Nomenklatur protein zona pelusida didasarkan pada mobilitas protein tersebut pada gel SDS-PAGE dari atas ke bawah dengan massa molekul relatif (M_r) berturut-turut makin kecil, yaitu ZP1, ZP2 dan ZP3. Identifikasi konstituen gZP pada penelitian ini juga menghasilkan tiga *band* yang selanjutnya disebut gZP1, gZP2 dan gZP3.

Pada penelitian ini isolasi protein yang berasal dari *band* ketiga (gZP3) SDS-PAGE diperoleh suspensi glikoprotein gZP3 sebanyak 9,5 ml dengan konsentrasi 290,547 µg/ml. Dengan demikian diperoleh protein gZP3 total sebanyak 2.760,1965 µg. Protein gZP3 tersebut selanjutnya dipakai pada serangkaian penelitian untuk konfirmasi peranannya sebagai reseptor fertilisasi, dan pengujian potensinya sebagai bahan imunokontrasepsi pada mencit (*Mus musculus*) hewan coba model.

Protein ZP1, ZP2 dan ZP3 merupakan 95 % atau lebih penyusun zona pelusida. Pada mencit terdapat sekitar 5 ng protein zona pelusida per oosit (Hemachand *et al*, 2002). Menurut Dale dan Elder (2000), protein merupakan 70 % komponen penyusun zona pelusida mencit (*Mus musculus*), sedangkan komponen lain adalah heksose 20 %, sialat 3 % dan sulfat 2 %. Formasi zona pelusida mutlak membutuhkan komponen ZP2 dan ZP3, sedangkan ZP1 tidak penting. Oosit mencit tanpa ZP2 menyebabkan defek struktur zona pelusida, oosit mencit tanpa ZP3 menyebabkan tidak terbentuknya struktur zona pelusida, dan steril. Oosit mencit tanpa ZP1 tetap mempunyai lapisan zona pelusida, dan tetap fertil (Rankin dan Dean, 2000). Hal ini disebabkan secara struktural ZP3 dan ZP2 membentuk kerangka yang saling menyilang, sedangkan ZP1 sebagai jembatan penghubung di beberapa bagian, sebagaimana digambarkan Green (1997) yang dikutip sebagai Gambar 2.3. Pada fertilisasi (secara fungsional) ZP3 berperan sebagai reseptor primer, sedangkan ZP2 sebagai reseptor sekunder pengenalan terhadap spermatozoa (Brewis dan Wong, 1999).

Analisis regresi berdasarkan data *marker* pada gel hasil SDS-PAGE dan data *Mr* masing-masing *marker* pada manual *SDS-PAGE Molecular Weight Standards* (Catalog Number 161-0317, Bio-Rad), diperoleh persamaan regresi linier : $y = 5,272 - 0,705x$. Penghitungan pada masing-masing lima *lane* hasil SDS-PAGE didapat hasil bahwa *Mr* gZP1 adalah 120.67 ± 6.12 ; *Mr* gZP2 adalah 94.38 ± 1.66 dan *Mr* gZP3 82.05 ± 6.90 kDa.

Hasil tersebut di atas sesuai dengan pernyataan Barber dan Fayrer-Hosken (2000) bahwa *Mr* glikoprotein konstituen zona pelusida, yaitu ZP1, ZP2 dan Zp3 pada beberapa spesies berturut-turut mempunyai rentangan antara 80 – 200, 50 – 120 dan 45 – 110 kDa. Sebagai perbandingan pada mencit (*Mus musculus*) *Mr* ZP1, ZP2 dan ZP3 berturut-turut sebesar 200, 120 dan 83 kDa. Pada manusia (*Homo sapiens*) *Mr* ZP1, ZP2 dan ZP3 berturut-turut 90 – 110, 64 – 78, dan 57 – 73.

Sebanyak 10 μ l isolat (mengandung 2,9 μ g gZP3) diencerkan dalam *Laemli buffer* 1 : 1. Larutan tersebut selanjutnya dipaparkan pada sumuran SDS-PAGE 12 % seperti pada proses yang dilakukan sebelumnya. *Running* ulang tersebut ternyata benar menghasilkan *band* tunggal dengan jarak migrasi sejauh 32 mm atau berkedudukan diantara marker *phosphorilase b* (*Mr* 97,40) dan marker *Bovine serum albumin* (*Mr* 66,20).

Pemeriksaan gel hasil SDS-PAGE dengan densitometri dilakukan untuk konfirmasi *band* yang terbentuk pada gel dan pengukuran kadar protein pada masing-masing *lane*-nya (Aulanni'am, 2004). Hasil pemeriksaan dengan

Densitometri terhadap *lane marker*, *lane gZP* dan *gZP3* diketahui bahwa masing-masing *band* ditandai oleh puncak (*peak*) kurva, dengan ketinggian kurva (*hieght*) sebagai intensitas densitograf. Pada penelitian ini telah diperoleh konfirmasi keberadaan *band* yang sesuai dengan densitogramnya. Kesesuaian tersebut ditandai dengan kesamaan letak *band* dan letak puncak (*peak*) densitogram. Kesesuaian terdapat baik pada *lane marker*, *lane sampel gZP* (terdiri dari *band gZP1*, *gZP2*, dan *gZP3*) maupun *lane gel hasil SDS-PAGE ulang isolat gZP3* (Gambar 5.5 pada Bab Hasil Penelitian).

Identifikasi *band* tunggal hasil SDS-PAGE ulang isolat *gZP3* pada Densitometer juga menghasilkan *peak* tunggal dengan jarak migrasi sejauh 32 mm, sesuai dengan jarak migrasi *gZP3* pada gel hasil SDS-PAGE *gZP3* maupun *gZP*. Pada densitograf tampak kurva tunggal dengan ketinggian 75,9 mm dan luas daerah di bawah kurva sebesar 1235,2 mm². Adanya kurva tunggal tersebut menunjukkan bahwa isolat protein yang diperoleh benar-benar *band* ketiga (*gZP3*) yang dimaksud pada gel hasil SDS-PAGE.

Ketebalan *band* pada gel hasil SDS-PAGE dikuantifikasi dalam bentuk luas daerah di bawah kurva (*area*) pada kurva densitograf. Kuantitas tersebut menunjukkan proporsi kadar protein pada gel (Green, 1997 ; Hemachand *et al*, 2002). Pada zona pelusida kambing *band* paling tebal adalah *band gZP3*, kemudian diikuti *band gZP2* dan paling tipis *band gZP1*. Adanya data bahwa *band gZP3* adalah yang paling tebal, menunjukkan bahwa *gZP3* mempunyai proporsi massa paling banyak dibandingkan *gZP1* dan *gZP2* pada zona pelusida

kambing. Konstituen ZP3 mempunyai proporsi terbesar karena fungsi utama zona pelusida dalam fertilisasi adalah untuk pengenalan primer spermatozoa terhadap oosit yang selanjutnya menginduksi reaksi akrosom pada spermatozoa tersebut. Untuk mendukung fungsi tersebut, menurut Tsubamoto *et al* (1999), ZP3 dan ZP2 membentuk kerangka yang dihubungkan oleh ZP1 di beberapa bagian, sebagaimana digambarkan Green (1997) yang dikutip sebagai Gambar 2.3 pada Tinjauan Pustaka penelitian ini.

Luas daerah di bawah kurva densitogram pada ZP1, ZP2 dan ZP3 kambing berturut-turut sebesar $2505,88 \pm 366,19 \text{ mm}^2$; $10710,75 \pm 557,62 \text{ mm}^2$ dan $22963,45 \pm 1346,50 \text{ mm}^2$. Berdasarkan data tersebut dapat dihitung persentase komposisi gZP1, gZP2 dan gZP3 penyusun zona pelusida kambing secara berurutan sebesar 6,93 ; 29,60 dan 63,47 % (Gambar 5.6). Sebagai data pembandingan diketahui bahwa rasio antara ZP3 dan ZP2 pada mencit (*Mus musculus*) adalah 1 : 1, sedangkan ZP1 sebesar 9 % (Rankin dan Dean, 2000).

Hasil imunisasi mencit (*Mus musculus*) betina dengan 40 μg protein gZP3 dalam *Freund Adjuvant* dengan dua kali *booster*, menunjukkan adanya titer antibodi yang lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan titer antibodi mencit betina kelompok kontrol (Gambar 5.7). Hewan coba kontrol pada penelitian ini hanya disuntik larutan NaCl fisiologis. Pada semua hewan coba kelompok kontrol didapatkan titer antibodi yang tidak sama dengan nol.

Elisa untuk menera titer antibodi dalam serum dengan antigen yang homolog menghasilkan reaksi positif paling kuat, namun reaksi silang dapat juga

terjadi (Paterson *et al*, 1999 ; Sadler *et al*, 2000 ; Hasegawa *et al*, 2002 ; Paterson *et al*, 2002 ; Srivastava *et al*, 2002). Anti serum terhadap peptida zona pelusida babi, kelinci dan manusia masing-masing paling kuat bereaksi terhadap peptida yang homolog, tetapi dapat juga terjadi reaksi silang dengan derajat yang berbeda-beda diantara ketiganya (Hasegawa *et al*, 2002).

Pada serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol dikenali oleh protein gZP3 dengan titer antibodi dengan rerata $44 \pm 12,65$. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam serum hewan coba tersebut terdapat klon IgG yang dikenali oleh epitop peptida pada *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc pada gZP3. Menurut Zhu dan Naz (1999), terdapat homologi susunan asam amino ZP3 antar spesies mamalia. Dikenalnya protein gZP3 oleh serum mencit kontrol tersebut menunjukkan adanya homologi susunan asam amino antara gZP3 dengan ZP3 mencit (*mice zona pellucida-3*, mZP3). Adanya homologi tersebut memberi peluang pemakaian protein gZP3 sebagai bahan imunokontrasepsi untuk dicoba pada mencit sebagai hewan model sebelum kelak diteliti lebih lanjut untuk diterapkan pada wanita.

Hasil penelitian imunisasi kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dengan 200 μ g gZP3 dalam *Freund adjuvant* dengan dua kali *booster* dengan interval 14 hari, menghasilkan serum (*post immune serum*) dengan titer antibodi dalam rentangan antara 2560 – 10240 dan rerata sebesar $7.840 \pm 1583,92$ (Gambar 5.9). Pada Kelinci jantan, gZP3 benar-benar merupakan protein asing. Titer antibodi kelinci sebelum imunisasi (*pre immune serum*) menunjukkan angka nol.

Hal ini disebabkan hewan coba yang dipakai untuk memproduksi antibodi adalah hewan jantan. Hewan jantan tidak memiliki zona pelusida, sehingga tidak terdapat suatu protein yang memiliki homologi susunan asam amino dengan protein gZP3. Tidak adanya homologi susunan asam amino tersebut menyebabkan serum kelinci jantan sebelum imunisasi tidak mengandung autoantibodi terhadap ZP3-nya sendiri yang dapat dikenali oleh protein gZP3 dalam uji Elisa. Menurut Austyn dan wood (2000), Goldsby *et al* (200) dan Abbas *et al* (2000), titer antibodi sebagai ukuran kuantitas respon imun atau imunogenisitas terutama dipengaruhi oleh faktor keasingan antigen oleh hospes. Titer antibodi kelinci jantan yang lebih tinggi dibandingkan titer antibodi mencit, karena gZP3 merupakan protein yang sama sekali asing bagi kelinci.

Data titer antibodi hasil imunisasi tersebut menunjukkan sifat imunogenisitas protein gZP3 pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) maupun kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Antibodi terbentuk setelah dilakukan penyuntikan imunogen gZP3. Protein asing gZP3 yang disuntikkan ke dalam tubuh hewan coba akan memicu serangkaian proses respon imun. Imunogen gZP3 mula-mula ditangkap oleh sel limfosit B. Sel B kemudian berdeferensiasi menjadi sel Blast, selanjutnya menjadi sel Plasma penghasil antibodi (Goldsby *et al*, 2000). Protein gZP3 sebagai antigen (Ag) juga mengalami internalisasi oleh sel-sel dendritik sebagai *antigen presenting cells* (APC). Protein gZP3 mula-mula mengalami endositosis, masuk ke dalam sel APC sebagai endosom. Di dalam endosom oleh peristiwa enzimatik protein gZP3 terdegradasi menjadi fragmen-

fragmen *variant* (epitop) dan fragmen-fragmen *invariant* (bukan epitop). Fragmen-fragmen *invariant* mengalami proses degradasi lebih lanjut dalam lisosom. Bersamaan dengan peristiwa tersebut molekul *major histocompatibility complex* (MHC) II dikirim dari *Golgi apparatus* menuju endosom. Molekul MHC II selanjutnya akan mengikat fragmen-fragmen *variant* sebagai epitop gZP3. Epitop-epitop gZP3 membentuk kompleks dengan molekul MHC II yang selanjutnya dipaparkan dipermukaan APC untuk dikenali oleh sel T *helper*. Sel-sel T *helper* mengenali kompleks Ag-MHC II pada permukaan APC melalui reseptor CD4⁺ sehingga mengaktifasi sel T untuk memproduksi sitokin. Sitokin menyebabkan sel B berinteraksi dengan T *helper* sehingga sel B berdeferensiasi menjadi sel-sel memori dan sel plasma penghasil antibodi (Abbas *et al*, 2003).

Selain respon imun humoral, imunisasi hewan coba dengan sediaan ZP3 dapat juga menghasilkan respon imun seluler yang dapat merusak struktur fungsional ovarium. Timbulnya kelainan pada ovarium tersebut erat kaitannya dengan keberadaan epitop sel T pada imunogen. Hal tersebut dibuktikan bahwa kelainan ovarium dapat diinduksi dengan transfer sel T CD4⁺ dari mencit yang diimunisasi dengan sediaan ZP ke mencit resipien, tetapi tidak terjadi melalui transfer antibodi ZP3. Sel T CD4⁺ dari mencit juga dapat mengenali peptida zona pelusida mencit pada *antigen presenting cells* (APC) dalam ovarium. Pengenalan tersebut berakibat perekrutan makrofag, sekresi sitokin dan peradangan ovarium (Barber dan Fayerer-Hosken, 2000). Gangguan ovarium

berupa percepatan pengosongan *germ pool* tersebut pada wanita dapat menyebabkan menopause dini (Paterson *et al*, 2002).

Imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan gZP3, menyebabkan peningkatan titer antibodi, tetapi tidak menimbulkan kelainan ovarium. Struktur fungsional ovarium yang dinyatakan dengan rerata jumlah folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, folikel de Graaf maupun korpus luteum masing-masing hewan coba setelah perlakuan ternyata tidak menunjukkan perubahan nyata ($p > 0,05$) (Mustofa, 2005). Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian lain bahwa tidak berubahnya struktur fungsional ovarium mengakibatkan tidak berubahnya siklus birahi hewan coba setelah imunisasi dengan gZP3 (Mustofa dkk., 2003).

Pada penelitian ini, uji spesifisitas dengan metode *Dot blotting* dilakukan untuk memastikan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) maupun mencit (*Mus musculus*) hasil imunisasi masing-masing hewan coba dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 (Beesley, 1993).

Berdasarkan Gambar 5.9, terdapat reaksi positif pengenalan antibodi gZP3 baik asal mencit maupun asal kelinci dengan protein gZP3 dibandingkan kontrol. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) maupun serum mencit (*Mus musculus*) hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 yang dibutuhkan untuk penelitian lebih lanjut. Gradasi warna noda antibodi asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) lebih pucat dibandingkan asal mencit (*Mus*

musculus). Hal tersebut memberikan gambaran terdapat lebih banyak ragam klon IgG anti gZP3 asal serum mencit yang terikat pada protein gZP3 dibandingkan jumlah ragam klon IgG anti gZP3 asal serum kelinci.

Menurut Rantam (2003) dan Abbas *et al* (2003), antibodi poliklonal mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen. Pada penelitian ini protein gZP3 yang diimunisasikan pada mencit (*Mus musculus*) menghasilkan antibodi poliklonal. Menurut Zhu dan Naz (1999) terdapat homologi susunan asam amino antar spesies pada mammalia. Susunan asam amino gZP3 sampai saat ini belum diketahui (publikasi yang ada adalah susunan asam amino *bovine ZP3*, bZP3), namun diyakini terdapat homologi asam amino antara gZP3 dengan mZP3. Pada *Dot blot* beberapa epitop protein gZP3 dapat dikenali oleh antibodi yang sudah ada dalam serum mencit (auto antibodi akibat adanya homologi susunan asam amino gZP3 dengan mZP3) maupun antibodi gZP3 hasil imunisasi hewan coba tersebut dengan protein gZP3.

Pada saat dilakukan imunisasi pada mencit betina, beberapa epitop protein gZP3 yang homolog dengan protein epitop mZP3, langsung berinteraksi dengan beberapa klon IgG dan dengan sel-sel memori. Sel memori sensitif terhadap rangsangan oleh imunogen yang sama. Reaksi tersebut menyebabkan proliferasi cepat sel-sel memori menjadi sel plasma penghasil antibodi. Menurut Goldsby *et al* (2000), respon imun yang terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas yang tinggi, serta dengan spesifisitas yang juga tinggi. Menurut Smith (1995), dalam

keadaan spesifisitas yang luas atau spesifisitas terhadap tiap satuan epitop rendah, menghasilkan sensitivitas yang tinggi. Populasi antibodi yang memiliki keragaman tinggi menghasilkan beberapa klon antibodi dengan afinitas yang berbeda-beda. Klon antibodi dengan afinitas yang tinggi cenderung mendominasi klon antibodi dengan afinitas rendah.

Pada *Dot blot* serum asal kelinci, protein gZP3 hanya berikatan dengan antibodi gZP3, karena kelinci yang dipakai sebagai hewan coba adalah kelinci jantan. Pada kelinci jantan tidak dijumpai protein yang homolog dengan gZP3 yang dibuktikan dengan titer nol pada serum hewan coba sebelum diimunisasi dengan protein gZP3 (Tabel 5.4 dan Gambar 5.8). Hasil *Dot blot* tersebut menunjukkan bahwa antibodi gZP3 asal serum kelinci sangat spesifik terhadap protein gZP3, namun mempunyai afinitas yang rendah.

Protein gZP3 tidak dikenali oleh serum kelinci jantan sebelum imunisasi, sebab hewan jantan tidak memiliki ZP3 yang memungkinkan adanya klon IgG yang mengenali epitop gZP3. Imunisasi kelinci jantan dengan protein gZP3 menghasilkan sejumlah klon IgG yang sangat spesifik hanya terhadap gZP3. Menurut Smith (1995), dalam pembentukan antibodi yang sangat spesifik, menghasilkan sifat antibodi yang afinitasnya relatif seragam, sehingga sensitivitasnya rendah.

Uji *indirect immunofluorescence* dapat dipakai untuk mengidentifikasi keberadaan reseptor fertilisasi pada zona pelusida maupun pada spermatozoa. Prinsip reaksi ini adalah reaksi spesifik reseptor-ligan, antigen-antibodi dan

antibodi-anti terhadap antibodi tersebut (antibodi sekunder) yang terlabel suatu penanda (Kiernan, 1990). Visualisasi terhadap reaksi tersebut dilakukan dengan menggunakan antibodi sekunder, yaitu *conjugate rabbit anti mice IgG* terlabel dengan *fluoro iso thio cianate* (FITC) (Burgess, 1995 ; Rantam, 2003).

Pada pengujian keberadaan reseptor fertilisasi pada zona pelusida, preparat yang digunakan dapat berupa preparat histologis ovarium (Govind *et al*, 2000 ; Srivastava *et al*, 2002) ; oosit (Hasegawa *et al*, 2002 ; Hemachand *et al*, 2002), embrio (Hemachand *et al*, 2002) atau spermatozoa. Pada penelitian ini target organ yang ingin diketahui reseptornya adalah zona pelusida kambing. Untuk memudahkan membuat preparat ulas di atas gelas obyek terlebih dahulu zona pelusida kambing disonikasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa antibodi sekunder yang terlabel FITC tidak dapat mengenali zona pelusida kambing pada sediaan kontrol sebagaimana tampak pada Gambar 5.8 (a). Sedangkan zona pelusida kambing yang dipapar dengan antibodi gZP3 dari serum mencit (*Mus musculus*), dicuci, selanjutnya dipapar dengan antibodi sekunder terlabel FITC, kemudian dicuci sekali lagi, ternyata menghasilkan adanya fluoresensi sebagaimana pada Gambar 5.8 (c). Hasil ini menunjukkan bahwa antibodi gZP3 yang dihasilkan dari imunisasi mencit (*Mus musculus*) dapat mengenali zona pelusida kambing.

Imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan 40 µg gZP3 menyebabkan infertilitas semua hewan coba (Mustofa dkk, 2004a). Di dalam tubuh mencit yang diimunisasi dengan gZP3, antibodi gZP3 yang terbentuk terikat secara sterik

pada pada *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc pada zona pelusida, sehingga menghalangi spermatozoa untuk membuahi.

Keberadaan *egg binding protein* pada spermatozoa dapat diidentifikasi dengan teknik imunofluoresen, yaitu menggunakan antibodi terhadap spermatozoa (Camona *et al*, 2002 ; Hemachand *et al*, 2002). Uji tersebut dapat juga dilakukan untuk mengetahui hubungan reseptor fertilisasi pada zona pelusida (*sperm receptor*) dengan ligannya, yaitu *egg binding protein* pada permukaan membran plasma spermatozoa. Hemachand *et al* (2002) melakukan pengujian keberadaan *egg binding protein* pada permukaan membran spermatozoa dengan mereaksikan preparat ulas spermatozoa dengan ZP3 (reaksi reseptor-ligan) selanjutnya direaksikan dengan antibodi ZP3 dan divisualisasikan dengan antibodi sekunder terlabel FITC.

Penelitian ini dilaksanakan seperti teknik yang dilakukan Hemachand *et al* (2002) seperti tersebut di atas. Pada kontrol (tidak berfluoresensi), antibodi sekunder terlabel FITC tidak dapat langsung terikat pada membran plasma spermatozoa sebagaimana tampak pada Gambar 5.8 (b). Reaksi positif fluoresensi, sebagaimana Gambar 5.8 (d), terjadi apabila preparat ulas spermatozoa kambing dipapar dengan proteing ZP3 terlebih dahulu, kemudian dicuci. Selanjutnya sediaan dipapar dengan antibodi gZP3, dicuci lagi, baru dipapar dengan antibodi sekunder terlabel FITC, sekali lagi dicuci. Hasil imunofluoresen ini menunjukkan bahwa protein gZP3 adalah reseptor yang dapat dikenali oleh ligannya pada spermatozoa kambing. Protein gZP3 tersebut

dapat bereaksi dengan antibodi gZP3. Antibodi asal mencit selanjutnya dapat berikatan dengan antibodi anti mice terlabel FITC.

Uji spesifisitas dengan metode *Dot blot* dilakukan untuk memastikan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) maupun asal mencit (*Mus musculus*) hasil imunisasi masing-masing hewan coba 5.9, terdapat reaksi positif pengenalan antibodi gZP3 (sub kolom perlakuan, P) dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3. Berdasarkan Gambar dengan protein gZP3 dibandingkan kontrol (sub kolom K). Hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) maupun serum mencit (*Mus musculus*) hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 yang dibutuhkan untuk penelitian lebih lanjut.

Gradasi warna noda hasil *Dot blotting* dipengaruhi oleh kadar antigen protein gZP3, pengenceran antibodi dalam serum dan spesies asal serum. Kadar antigen dan konsentrasi antibodi yang tinggi menghasilkan gradasi warna yang lebih tajam. Gradasi warna noda pada sub kolom perlakuan (P) antibodi asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) (kolom R), pada kadar protein gZP3 dan pengenceran serum yang sama, ternyata lebih rendah intensitasnya dibandingkan serum asal mencit (*Mus musculus*) (kolom M).

Menurut Abbas *et al* (2003) dan Rantam (2003), antibodi poliklonal mempunyai afinitas yang tinggi terhadap antigen daripada antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal banyak mengandung klon IgG yang kurang spesifik, sedangkan antibodi monoklonal hanya mengandung satu jenis klon IgG yang

sangat spesifik terhadap antigennya, namun memiliki afinitas yang lebih rendah dibandingkan antibodi poliklonal.

Pada penelitian ini protein gZP3 yang diimunisasikan pada mencit (*Mus musculus*) menghasilkan antibodi poliklonal. Menurut Zhu dan Naz (1999) terdapat homologi susunan asam amino antar spesies pada mammalia. Meskipun belum diketahui susunan asam amino gZP3, namun juga diyakini terdapat homologi susunan asam amino antara gZP3 dengan ZP3 mencit (*Mus musculus*), yaitu *mice zona pellucida 3* (mZP3). Terdapatnya homologi tersebut menyebabkan adanya titer antibodi dalam serum mencit betina kontrol pada peneraan dengan Elisa sebagaimana Tabel 5.3 dan Gambar 5.7 pada Hasil Penelitian.

Pada *Dot blot* beberapa epitop protein gZP3 dapat dikenali oleh antibodi yang sudah ada dalam serum mencit (auto antibodi akibat adanya homologi susunan asam amino gZP3 dengan mZP3) maupun antibodi gZP3 hasil imunisasi hewan coba tersebut dengan protein gZP3. Pada *Dot blot* serum asal kelinci, protein gZP3 hanya berikatan dengan antibodi gZP3, karena kelinci yang dipakai sebagai hewan coba adalah kelinci jantan. Pada kelinci jantan tidak dijumpai protein yang homolog dengan gZP3 yang dibuktikan dengan titer nol pada serum hewan coba sebelum diimunisasi dengan protein gZP3 (Tabel 5.4 dan Gambar 5.13). Hasil *Dot blot* tersebut menunjukkan bahwa antibodi gZP3 asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sangat spesifik terhadap protein gZP3, namun mempunyai afinitas yang rendah.

6.2. Uji *Binding* Antibodi dan Protein Reseptor Fertilisasi Kambing (gZP3) dengan teknik Fertilisasi *in vitro*

Pada penelitian ini hendak dibuktikan apakah protein gZP3 adalah reseptor fertilisasi kambing. Antibodi gZP3 diuji perannya dalam menghambat oosit untuk mengalami fertilisasi, sedangkan protein gZP3 diuji perannya dalam menghambat spermatozoa untuk melakukan fertilisasi. Hambatan fertilisasi pada penelitian ini diukur berdasarkan besarnya angka *cleavage*. Angka *cleavage* adalah persentase embrio stadium *cleavage* yang berkembang 48 jam setelah inseminasi *in vitro*. Embrio stadium *cleavage* adalah embrio yang berkembang 2-32 sel tanpa diikuti pertambahan volume embrio. Hambatan fertilisasi efektif apabila terjadi penurunan yang berbeda nyata ($p < 0,05$) angka *cleavage* pada kelompok perlakuan oosit dan kelompok perlakuan spermatozoa dibandingkan kelompok kontrol.

Pada Penelitian I telah dibuktikan dengan teknik imunofluoresen bahwa protein gZP3 dapat mengenali membran plasma spermatozoa kambing. Apabila pada Penelitian II ini dapat dibuktikan bahwa antibodi gZP3 dan protein gZP3 sesuai dengan peran masing-masing ternyata dapat menghambat fertilisasi, maka disimpulkan bahwa protein gZP3 merupakan reseptor fertilisasi kambing.

Teknik fertilisasi *in vitro* terdiri dari beberapa tahapan, yaitu maturasi oosit, kapasitas spermatozoa, dan inseminasi *in vitro*. Uji imunokontrasepsi dengan teknik fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan pada tahap maturasi oosit jika target imunokontrasepsinya adalah oosit (Rankin *et al*, 2001 ; Hasegawa *et al*,

2002) atau pada tahap kapasitas spermatozoa bila target imunokontrasepsinya adalah spermatozoa (Naz dan Zhu, 1998 ; Ramalho-Santos *et al*, 2000).

Fertilisasi terdiri dari beberapa tahapan, yaitu kontak dan pengenalan antara membran plasma spermatozoa dengan zona pelusida, pengikatan spermatozoa oleh zona pelusida, dilanjutkan reaksi akrosom pada spermatozoa, perlekatan sekunder spermatozoa dengan zona pelusida dan penetrasi spermatozoa ke zona pelusida, reaksi kortikal untuk mencegah polispermi, serta fusi inti antara kedua gamet (Hemachand *et al*, 2002). Peranan zona pelusida dalam pengenalan awal dan sebagai pengikat spermatozoa terhadap oosit dapat dimanfaatkan untuk tujuan kontrasepsi. Zona pelusida mengandung sejumlah antigenik determinan termasuk karbohidrat, protein dan konformasi-konformasi epitopnya. Immunogenesitas komplek glikoprotein ini bervariasi pada mamalia (Skinner *et al*, 1999). Terdapatnya reaksi silang antara antigen glikoprotein zona pelusida dengan antibodi glikoprotein zona pelusida beberapa spesies yang berbeda adalah karena adanya homologi susunan asam amino protein zona pelusida. Adanya homologi tersebut memungkinkan dilakukannya imunisasi pada hewan coba heterolog (Srivastava *et al*, 2002).

Penelitian fertilisasi *in vitro* pada oosit dan spermatozoa kambing ini, dilaksanakan di Sub Laboratorium Fertilisasi *in vitro*, Laboratorium Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Penelitian-penelitian dengan teknik fertilisasi *in vitro* dengan berbagai tujuan telah berjalan dengan baik di laboratorium tersebut sejak awal tahun 1990 (Mahaputra dkk, 1992). Hal ini

didasarkan pada hasil-hasil penelitian sebelumnya di Laboratorium yang sama. Fertilisasi *in vitro* pada sapi menghasilkan angka *cleavage* berkisar antara 57,1 % sampai dengan 75 %. Mustofa dkk. (1999) mendapatkan angka *cleavage* sebesar 58,71 % dengan suplementasi 10 % serum sapi Friesian Holstein (FH) birahi pada media maturasi oosit untuk meningkatkan perolehan oosit matang. Utama dkk. (2002) mendapatkan angka *cleavage* sebesar 60,3 % dengan perlakuan pemberian ko-kultur menggunakan monolayer sel-sel kumulus dan epitel tuba Fallopii. Angka *cleavage* tertinggi, sebesar 75 % dicapai dengan suplementasi media maturasi oosit dengan kombinasi FSH-LH-Estrogen (Mahaputra dan Mustofa, 2002). Penelitian fertilisasi *in vitro* dengan beberapa perlakuan pada spermatozoa sapi untuk mendapatkan embrio dengan jenis kelamin yang dikehendaki menghasilkan angka *cleavage* sebesar 57,1 % (Mahaputra dan Mustofa, 2001).

Pada penelitian ini perbandingan angka *cleavage* antara kelompok kontrol dan perlakuan dalam bentuk diagram batang dapat dilihat pada Gambar 5.11. Pada kelompok kontrol menghasilkan angka *cleavage* dengan rerata $38,07 \pm 5,23$ %. Data tersebut menunjukkan bahwa angka *cleavage* pada kelompok kontrol penelitian ini relatif tidak jauh berbeda dibandingkan kontrol penelitian-penelitian yang telah dilakukan pada sapi maupun pada kambing di laboratorium yang sama. Hal ini berarti hasil fertilisasi *in vitro* kelompok kontrol pada penelitian ini sudah optimal, dapat dipakai sebagai pembanding terhadap kelompok perlakuan. Penelitian sebelumnya pada kelompok kontrol, angka

cleavage pada fertilisasi *in vitro* sapi sebesar 38,9 % (Mahaputra dan Mustofa, 2002). Pada fertilisasi *in vitro* menggunakan oosit dan spermatozoa kambing, Restiadi (2001) mendapatkan angka *cleavage* relatif sama dengan hasil tersebut di atas, yaitu sebesar 40,89 % pada kelompok kontrol.

Penambahan antibodi sebesar 1024/ml dalam bentuk suplementasi 10 % *post immune serum* asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang mengandung antibodi gZP3 dengan titer 10.240 atau dengan nilai *Optical Density* antara 1,438 – 1,537 menghasilkan angka *cleavage* sebesar $4,26 \pm 3,78$ %. Angka *cleavage* kelompok perlakuan tersebut jauh lebih kecil ($p < 0,05$), hampir sepersembilan dibandingkan kelompok kontrol, yaitu sebesar $38,07 \pm 5,23$ %. Kegagalan fertilisasi terjadi karena antibodi gZP3 secara sterik terikat pada epitop *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc pada oosit kambing, sehingga menghalangi terikatnya spermatozoa.

Uji fertilisasi *in vitro* dalam pengembangan metode immunokontrasepsi dimaksudkan untuk membuktikan bahwa bahan yang diuji dapat mencegah fertilisasi. Namun, dalam menentukan target hasil pengujian menggunakan hewan coba model, tidak harus mencapai kegagalan fertilisasi 100 %. Potensi immunokontraseptif dianggap efektif apabila terjadi penurunan secara nyata ($p < 0,05$) angka fertilisasi kelompok perlakuan dibandingkan kelompok kontrol. Beberapa publikasi hasil penelitian di bawah ini menunjukkan hal itu.

Penelitian untuk menguji antibodi yang diinduksi pada kelinci terhadap *Glutathione-S Transferase* (GST), yaitu suatu protein yang ada pada

spermatozoa kambing, menghasilkan angka fertilisasi sebesar $69 \pm 2,9$ % pada kontrol, serta berturut-turut $29 \pm 0,6$ % dan $9 \pm 1,1$ % pada kelompok perlakuannya (Gopalakrishnan dan Shaha, 1998). Ramalho-Santos *et al* (2000) menggunakan *Rabbit polyclonal antibody* protein membran plasma spermatozoa SNARE dari spermatozoa sapi untuk perlakuan spermatozoa pada fertilisasi *in vitro* oosit sapi menghasilkan angka fertilisasi sebesar 63 % pada kelompok kontrol yang menggunakan *Pre immune serum*, dan masih menghasilkan fertilisasi sebesar 17 % pada kelompok perlakuan dengan *Post immune serum*. Naz dan Zhu (1998) menguji antibodi anti protein spermatozoa asal hewan murine yang diinduksi pada mencit dengan titer 18 – 23 ribu ternyata juga masih menghasilkan pembelahan embrio murine sebesar 4,8 %.

Penelitian *Hemi Zona Assay* dilakukan Govind *et al* (2000) menunjukkan hasil serupa. Serum dari kelinci yang diimunisasi dengan glikoprotein ZP3 kera Makaka (*Macaca radiata*) ternyata dapat menurunkan angka ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida kera Makaka. Pada kelompok kontrol, yaitu penambahan *pre immune serum* pada media, jumlah spermatozoa yang terikat pada hemi zona sebanyak $73,4 \pm 29,9$. Pada kelompok perlakuan penambahan *immune serum* pada media, ternyata tidak dapat memblok keseluruhan reseptor spermatozoa pada hemi zona, sehingga masih ditemukan $8,1 \pm 5,9$ spermatozoa yang terikat.

Pada zona pelusida terdapat sejumlah reseptor (ZP3) untuk pengenalan terhadap spermatozoa. Dengan teknik *Binding Assay*, Thaler dan Cardullo

(1996) menunjukkan bahwa terdapat *multiple receptor* pada zona pelusida yang dapat berikatan dengan *multiple ligand* pada permukaan membran plasma spermatozoa. Secara skematis keberadaan sejumlah ZP3 pada zona pelusida dijelaskan oleh Green (1997) sebagaimana Gambar 2.6 pada Tinjauan Pustaka. Pada ZP3 sendiri terdapat beberapa epitop *sperm receptors*. Govind *et al* (2000) telah memetakan adanya tujuh epitop sel B pada zona pelusida kera Bonet (*Macaca radiata*). Adanya ikatan terhadap salah satu epitop pada glikoprotein ZP3, secara sterik atau berdasarkan kedudukan stereometrik memblok masuknya reseptor fertilisasi pada membran plasma spermatozoa.

Reseptor fertilisasi pada beberapa spesies hewan berbeda-beda jumlahnya. Pada sapi, Yonezawa *et al* (2001) menyebutkan terdapat sekitar 58.000 reseptor dalam bentuk ZPB, sedangkan pada mencit (*Mus musculus*), Thaler dan Cardullo (1996) menyatakan angka yang lebih kecil, yaitu terdapat 30.000 reseptor. Perbedaan jumlah reseptor tersebut juga dapat diidentifikasi berdasarkan jumlah spermatozoa yang terikat pada zona pelusida dalam *Hemi Zona Assay* (HZA) atau *Binding Assay* (BA). Pada HZA antara zona pelusida dan spermatozoa manusia, Govind *et al* (2000) mendapatkan jumlah spermatozoa terikat sebanyak $63 \pm 9,8$ spermatozoa per zona pelusida. Dengan teknik *Binding Assay* pada kambing terjadi ikatan sebanyak $123 \pm 14,76$ spermatozoa per satuan oosit (Hemachand *et al*, 2000). Sedangkan pada Mencit (*Mus musculus*) diperoleh angka yang lebih kecil, yaitu antara $17,7 \pm 2,5$ (Rankin *et al*, 1998) sampai dengan 42 spermatozoa (Naz dan Zhu, 1998).

Hasil *Binding Assay* atau *Hemi Zona Assay* tanpa perlakuan pada beberapa referensi di atas, menggambarkan bahwa ZP3 sebagai reseptor fertilisasi pada zona pelusida bukanlah reseptor tunggal. Dengan demikian dibutuhkan kuantitas tertentu antibodi untuk memblok keseluruhan reseptor.

Menurut Barber dan Fayrer-Hosken (2000), hewan yang diimunisasi dengan substansi yang berasal dari zona pelusida, kadar IgG dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. Penelitian secara *in vivo*, imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan beberapa dosis gZP3 menunjukkan terjadinya infertilitas yang bersifat tergantung dosis (*dose dependent*). Kelompok kontrol menghasilkan kebuntingan 100 %, kelompok imunisasi dengan 10, 20 dan 40 µg menghasilkan kebuntingan berturut-turut 50 %, 20 % dan 0 % (Mustofa dkk, 2004a). Imunisasi dengan dosis protein yang lebih tinggi, menghasilkan titer antibodi yang juga lebih tinggi. Data tersebut menggambarkan bahwa titer antibodi yang lebih tinggi memblok lebih banyak reseptor, sehingga angka fertilisasi menurun. Uji potensi imunokontraseptif *in vitro* juga menunjukkan adanya *dose dependent* terhadap antibodi yang disuplementasikan pada media. Jewgenow *et al* (2000) melakukan fertilisasi *in vitro* oosit dan spermatozoa kucing yang mediana disuplementasi dengan antibodi *feline zona pellucida* (fZP) yang diinduksi pada kelinci, menunjukkan hambatan fertilisasi yang bersifat *dose dependent*. Lebih tinggi kadar serum yang disuplementasikan, menghasilkan angka hambatan fertilisasi lebih tinggi.

Pada ZP3 terdapat *multi receptor* yang berperan untuk berikatan dengan *multi ligand* pada membran plasma spermatozoa. Pada penelitian ini antibodi gZP3 diinduksi pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan. Antibodi yang dihasilkan dari imunisasi kelinci dengan protein gZP3 adalah antibodi poliklonal, sehingga terdapat mosaik ikatan antibodi – antigen yang tidak menutup rapat seluruh reseptor fertilisasi. Antibodi gZP3 menghambat fertilisasi bersifat *dose dependent*. Masih terjadinya fertilisasi pada sebagian oosit, menunjukkan bahwa antibodi gZP3 yang ditambahkan pada media maturasi oosit masih belum mampu menutup seluruh reseptor, yaitu ZP3 (*sperm receptor*) pada oosit hewan coba. Hal itu menyebabkan masih adanya peluang untuk terjadinya pembuahan, yang diikuti terbentuknya embrio stadium *cleavage*.

Antibodi yang dipaparkan pada maturasi oosit kambing pada fertilisasi *in vitro* penelitian ini, adalah antibodi yang dihasilkan oleh kelinci jantan setelah diimunisasi dengan protein gZP3 terlarut. Menurut Alberts *et al* (2002), konformasi tiga dimensi protein dapat berubah apabila dilakukan denaturasi pada rantai *prosthetic group*-nya. Pada penelitian ini zona pelusida kambing dilakukan pemrosesan dengan elektroforesis, sehingga terjadi perubahan dari protein gZP3 *in situ* pada zona pelusida kambing menjadi gZP3 natif dalam bentuk protein terlarut. Perubahan tersebut menyebabkan beberapa epitop protein mengalami perubahan konformasi bentuk tiga dimensi. Hasil imunisasi kelinci jantan dengan protein gZP3 terlarut menghasilkan beberapa beberapa klon antibodi yang memiliki afinitas rendah terhadap epitop peptida *back bone*

serine / threonine atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc gZP3 *in situ* pada zona pelusida oosit kambing. Beberapa klon antibodi gZP3 yang lain memiliki afinitas yang tinggi, karena memiliki *antigenic determinant* yang tepat sama dengan beberapa epitop gZP3. Hal ini menyebabkan tidak keseluruhan reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing tertutup dengan sempurna, sehingga masih ada peluang terjadinya fertilisasi.

Angka infertilitas pada penelitian pengujian potensi imunokontraseptif zona pelusida dengan teknik fertilisasi *in vitro* dapat juga dijelaskan berdasarkan struktur antibodi yang digunakan. Immunoglobulin G (IgG) merupakan antibodi yang dominan dalam sistem sirkulasi. Menurut Austyn dan Wood (2000) serta Goldsby *et al* (2000), struktur dasar IgG tersusun dari sepasang *Heavy (H) chain* dan *Light (L) Chain*. Masing-masing H dan L *chain* terdiri dari *V (Variable) region* dan *C (Constant) region*, sehingga terdapat V_H , V_L dan C_H , C_L . Pada *V region* (V_H dan V_L), terdapat *Antigen binding sites* yang spesifik terhadap antigen tertentu (lihat Gambar 2.5 pada Tinjauan Pustaka). Kerangka IgG pada *C region* (C_H dan C_L) bersifat spesifik sesuai dengan spesies asal antibodi tersebut. Pada *C region* terdapat *Hinge region* dan beberapa ikatan disulfida (Gambar 2.3.) untuk mempertahankan struktur IgG, yang juga bersifat spesies spesifik (Goldsby *et al*, 2000).

Protein gZP3 diimunisasikan pada dua spesies yang berbeda, masing-masing menghasilkan serum yang mengandung antibodi dengan *antigenic binding site* yang sama pada *V region*. Namun diantara kedua macam antibodi

terdapat perbedaan pada *C region*-nya yang bersifat spesies spesifik yang menyebabkan adanya perbedaan pada kemampuan fungsi biologis.

Pada penelitian ini antibodi gZP3 diperoleh dari imunisasi kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) dengan protein gZP3 terlarut, yang selanjutnya dipakai sebagai perlakuan pada fertilisasi *in vitro* pada oosit kambing (*Capra hircus*). Dengan demikian *antigenic binding site* beberapa klon antibodi gZP3 tepat dapat terikat dengan gZP3 pada zona pelusida kambing, sehingga mempunyai afinitas (daya gabung) yang tinggi. Namun, karena antibodi tersebut diinduksi pada spesies yang berbeda (kelinci), menyebabkan aviditasnya (kekuatan ikatan) rendah. Suatu antibodi (gZP3) asal hewan tertentu (kelinci), untuk berikatan dengan antigennya (ZP3, pada zona pelusida) pada hewan yang berbeda (kambing) harus mengalami perubahan konformasional pada struktur dasar immunoglobulinnya (Austyn dan Wood, 2000). Dalam keadaan demikian, menurut Goldsby *et al* (2000) untuk berikatan antara antibodi dengan antigen, *Hinge region* dan beberapa ikatan disulfida berubah posisi sedemikian rupa sehingga *antigenic binding site* mengalami pergeseran terbatas antara $1 - 2,7 \text{ \AA}$, sedangkan luas permukaan kontak antibodi – antigen dapat mencapai $650 - 900 \text{ \AA}^2$ yang melibatkan 15-22 asam amino.

Pada penelitian ini, penambahan gZP3 10 % atau dengan kadar $13,16 \mu\text{g}$ per ml dalam media kapasitasi spermatozoa Kambing menghasilkan angka *cleavage* hanya sebesar $9,58 \pm 6,70\%$. Angka tersebut juga lebih kecil ($p < 0,05$),

hampir seperempat angka *cleavage* kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan protein gZP3 menghambat peran spermatozoa kambing untuk membuahi oosit.

Pada membran plasma spermatozoa terdapat sejumlah ligan untuk mengenali zona pelusida. Teknik *Binding Assay* membuktikan bahwa terdapat *multiple ligand* pada permukaan membran plasma spermatozoa yang dapat berikatan dengan *multiple receptor* pada zona pelusida (Thaler dan Cardullo, 1996). Dengan model ikatan sterik, penambahan 10 % gZP3 pada media kapasitasi spermatozoa (mengandung 13,16 μg / ml media) belum mampu menutup seluruh ligan fertilisasi (*egg binding protein*) pada membran plasma spermatozoa kambing yang bersifat multi epitop. Hal ini menyebabkan masih adanya peluang terjadinya fertilisasi yang pada penelitian ini diamati berdasarkan angka *cleavage*.

Pada membran plasma spermatozoa terdapat sejumlah protein *multi ligand* yang berperan untuk berikatan dengan *multi receptor* pada ZP3. Ikatan *egg binding protein* pada membran plasma spermatozoa dengan ZP3 dipengaruhi oleh konformasi tiga dimensi protein ZP3. Menurut Hasegawa *et al* (2002) terdapat suatu *sequence* asam amino tertentu pada ZP3 yang berperan sebagai struktur antigen spesies-spesifik. Antisera terhadap peptida *human type* ZP3 (CTYILDPEKLTLRATYDN, atau dengan susunan asam amino Cysteine–Threonine – Tyrosine – Isoleucine – Leucine – Aspartic acid – Proline – Glutamic Acid – Lysine – Leucine – Threonine – Leucine – Arginine – Alanine – Threonine – Tyrosine – Aspartic acid – Asparagine) dan *rabbit type*

(CTYILDPEKLTLRVPYKA, atau dengan susunan asam amino Cysteine-Threonine – Tyrosine – Isoleucine – **Leucine – Aspartic acid – Proline – Glutamic Acid – Lysine** – Leucine – Threonine – Leucine – Arginine – Valine – Proline – Tyrosine – Lysine – Alanine), dapat mengblok *human sperm Binding Assay*. Sedangkan antisera *pig type* (CTYVLDPENLTLKAPYEA, atau dengan susunan asam amino Cysteine – Threonine – Tyrosine – Valine – **Leucine – Aspartic acid – Proline – Glutamic Acid – Asparagine** – Leucine – Threonine – Leucine – Alanine – Proline – Tyrosine – Glutamic acid – Alanine), ternyata tidak dapat mengblok *human sperm Binding Assay*. Berdasarkan susunan asam amino ketiga peptida tersebut di atas, ternyata terdapat persamaan delapan asam amino (LDPEKLTL) antara peptide *human type* dan peptida *rabbit type*. Pada *pig type* delapan asam amino pada regio yang sama mengalami penggantian K (Lysine) oleh N (Asparagine). Perbedaan satu asam amino tersebut menyebabkan struktur tiga dimensi antibodi terhadap peptida *pig type* kurang efektif, sehingga berakibat tidak cukup mempunyai afinitas untuk memblok *human sperm Binding Assay*. Hal tersebut di atas menunjukkan bahwa untuk memblok *egg binding* protein pada membran plasma spermatozoa dibutuhkan protein atau peptida dengan konformasi yang tepat pas sebagaimana *lock-key system* dengan epitop pada membran plasma spermatozoa. Selain itu, protein atau peptida tersebut harus memiliki afinitas dan aviditas yang tinggi terhadap epitop pada membran plasma spermatozoa.

Konformasi tiga dimensi protein dapat berubah apabila dilakukan denaturasi pada rantai *prosthetic group*-nya (Alberts *et al*, 2003). Pada penelitian ini diduga terjadi perubahan konformasi tiga dimensi protein gZP3 setelah dilakukannya pemrosesan dengan elektroforesis. Perubahan tersebut menyebabkan adanya perbedaan konformasi tiga dimensi antara protein gZP3 *in situ* pada zona pelusida kambing dengan gZP3 natif dalam bentuk protein terlarut. Protein gZP3 *in situ* pada zona pelusida kambing tepat dapat berikatan dengan *egg binding protein* pada membran plasma spermatozoa kambing, sebagaimana *lock-key system*. Perubahan konformasi protein gZP3 dalam bentuk *soluble protein* menyebabkan menurunnya afinitas ikatan protein gZP3 terlarut dalam media dengan *egg binding protein* pada membran plasma spermatozoa kambing. Ikatan dengan afinitas lemah gZP3 – membran plasma spermatozoa kambing menyebabkan spermatozoa tersebut masih dapat berikatan dengan gZP3 *in situ* pada zona pelusida oosit kambing. Keadaan tersebut memberi peluang beberapa spermatozoa kambing mampu *binding* pada zona pelusida oosit kambing, kemudian membuahi oosit kambing secara *in vitro* dan berlanjut menghasilkan embrio stadium *cleavage*.

Pada penelitian sebelumnya (Penelitian I) telah dibuktikan bahwa protein gZP3 yang dipaparkan pada preparat ulas spermatozoa kambing, kemudian dilanjutkan dengan pemaparan antibodi gZP3 dan antibodi *conjugate rabbit anti mice IgG* terlabel *fluoro isi thio cyanate* (FITC), ternyata menghasilkan fluoresensi pada membran plasma kepala spermatozoa kambing. Berdasarkan

hasil yang diperoleh dari penelitian pertama tersebut, disimpulkan bahwa gZP3 adalah suatu protein reseptor yang dapat dikenali oleh ligannya pada membran plasma spermatozoa kambing.

Pada penelitian kedua ini, dengan teknik fertilisasi *in vitro* menunjukkan terjadinya penurunan ($p < 0,05$) angka *cleavage* setelah perlakuan pemaparan serum yang mengandung antibodi gZP3 pada proses maturasi oosit dibandingkan dengan kontrol yang tidak mendapatkan pemaparan antibodi gZP3 pada oositnya. Demikian juga pada kelompok fertilisasi *in vitro* yang diberi pemaparan antigen protein gZP3 dalam proses kapasitasasi spermatozoa kambing, menghasilkan angka *cleavage* yang lebih rendah ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol yang tidak mendapatkan pemaparan protein gZP3 pada spermatozoanya. Hal-hal tersebut menggambarkan bahwa protein gZP3 yang diisolasi adalah reseptor fertilisasi (*sperm receptor*) pada zona pelusida kambing yang dikehendaki untuk diteliti potensi imunokontraseptifnya.

Penelitian pertama menunjukkan bahwa protein gZP3 dapat dikenali oleh serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol. Hal tersebut menggambarkan adanya homologi susunan asam amino gZP3 (sampai saat ini belum ada publikasi) dengan susunan asam amino mZP3 (Lampiran 10). Menurut Srivastava *et al* (2002) adanya homologi susunan asam amino ZP3 antar spesies memungkinkan dilakukannya pengujian potensi imunokontraseptif protein ZP3 tersebut pada hewan coba yang heterolog maupun penelitian penerapannya kelak pada wanita.

6.3.1. Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik Fertilisasi *in vitro* pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

Apabila suatu bahan imunokontrasepsi diaplikasikan pada wanita, maka antibodi yang terbentuk pada wanita tersebut memblok seluruh reseptor fertilisasi (ZP3) pada oosit yang diovulasikan, sehingga oosit gagal dikenali oleh spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dengan pemodelan, penerapan bahan imunokontrasepsi gZP3 pada wanita sebagaimana gambaran di atas. Protein gZP3 diimunitasikan pada mencit (*Mus musculus*), selanjutnya antibodi gZP3 yang dihasilkan diuji dengan teknik fertilisasi *in vitro* dan *Binding Assay* juga pada oosit mencit (*Mus musculus*).

Penelitian sebelumnya secara *in vivo* telah membuktikan bahwa gZP3 efektif sebagai imunokontrasepsi pada mencit (*Mus musculus*). Dosis dosis 40 µg gZP3 mencegah kebuntingan pada seluruh hewan coba (Mustofa dkk, 2004a), reversibel setelah 14 siklus birahi (Mustofa dkk, 2004b) dan tidak mempengaruhi gambaran histologis ovarium (Mustofa, 2005). Pada penelitian ini antibodi gZP3 didapatkan dari mencit (*Mus musculus*) betina setelah diimunitasi (*Post immune serum*) dengan 40 µg gZp3 dibandingkan serum hewan coba yang sama sebelum diimunitasi (*Pre immune serum*).

Uji Elisa *indirect* menunjukkan bahwa serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol yang pernah beranak dan serum wanita (*Homo sapiens*) kontrol yang pernah mempunyai anak, sama-sama dapat dikenali oleh protein gZP3.

Serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol dapat mengenali gZP3 dengan rerata titer $88 \pm 41,31$ dengan rentangan 40 – 160 (Mustofa dkk, 2004b). Reaksi silang antara protein gZP3 dengan serum mencit tersebut telah mendapatkan konfirmasi bahwa protein gZP3 sebagai imunogen dapat menghasilkan infertilitas pada mencit (*Mus musculus*) betina sebagai model.

Serum wanita (*Homo sapiens*) kontrol menunjukkan reaksi silang terhadap gZP3 lebih dari dua kali lipat dibandingkan serum mencit (*Mus musculus*) betina kontrol. Rerata titer antibodi serum wanita kontrol sebesar $496 \pm 231,86$ dengan rentangan antara 160 – 640 (Mustofa dkk, 2004b). Adanya pengenalan protein gZP3 oleh serum wanita (*Homo sapiens*) kontrol tersebut mengindikasikan adanya homologi susunan asam amino gZP3 dengan susunan asam amino zona pelucida-3 manusia (*human zona pellucida-3, hZP3*). Data tersebut memberikan prospek penelitian lanjutan untuk penggunaannya pada wanita (*Homo sapiens*) di masa depan.

Titer antibodi gZP3 serum mencit (*Mus musculus*) setelah imunisasi (*post immune serum*) lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibandingkan sebelum imunisasi (*pre immune serum*) (Gambar 5.12). Pembentukan antibodi dalam individu berdasarkan waktu imunisasi dapat dibedakan menjadi dua tahap, yaitu tahap respon imun primer dan tahap respon imun sekunder. Penyuntikan suatu imunogen ke dalam tubuh hewan akan menghasilkan antibodi spesifik dalam darah setelah beberapa waktu, yang disebut periode induktif. Antibodi dapat dideteksi 5 – 7 hari sesudah penyuntikan protein yang larut air. Setelah

timbulnya antibodi pertama dimulailah biosintesis aktif antibodi sehingga terjadi peningkatan konsentrasi antibodi secara logaritmik, yang mencapai titer antibodi tertinggi setelah 8 – 12 hari. Kadar antibodi setelah imunisasi adalah selisih antara angka sintesis dengan angka katabolik antibodi. Apabila angka ini sama, maka kadar antibodi konstan (fase plateau). Apabila angka katabolik lebih besar daripada angka sintesis, maka respon imun memasuki fase penurunan (Goldsby *et al*, 2000). Pemaparan kedua terhadap imunogen yang sama menyebabkan penambahan respon imun yang menyolok berupa munculnya sel-sel imunokompeten dan antibodi yang dipercepat. Pada respon imun sekunder periode laten lebih pendek, angka sintesis antibodi lebih cepat, puncak titer antibodi bertahan lebih lama, daya gabung (afinitas) antibodi lebih tinggi, dan lebih banyak terdapat sel memori (Goldsby *et al*, 2000 ; Abbas *et al*, 2003).

Pengujian kinerja antibodi dalam penelitian imunokontrasepsi dengan menggunakan teknik fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan pada oosit maupun spermatozoa. Apabila target imunokontrasepsinya adalah oosit, sebagaimana yang dilakukan pada penelitian ini, maka oosit diinkubasi dalam media yang disuplementasi dengan antibodi yang diuji sebelum diinseminasi *in vitro*, (Rankin *et al*, 2001 ; Hasegawa *et al*, 2002 ; Hardy *et al*, 2003).

Pada fertilisasi *in vitro* menggunakan hewan coba mencit (*Mus musculus*) maturasi oosit terjadi secara *in vivo* dalam oviduk. Pengujian suatu bahan untuk mengetahui kinerjanya pada oosit dapat dilakukan dengan menambahkan bahan tersebut pada media dan diinkubasi dalam inkubator dengan 5 % CO₂ pada

suhu 37 °C selama satu jam sebelum oosit diinseminasi oleh spermatozoa (Rankin *et al*, 2001).

Pada penelitian ini terbukti bahwa suplementasi media fertilisasi *in vitro* dengan 10 % *post immune serum* dengan titer 640, mencegah fertilisasi pada seluruh oosit. Sedangkan pada kelompok kontrol (*pre immune serum*), seluruh oosit mengalami fertilisasi yang ditandai dengan terdegradasinya sel-sel kumulus dan terbentuknya *polar body II*. Hasil penelitian tersebut identik dengan laporan Naz dan Zhu (1998) tentang pengujian antibodi terhadap protein FA-1 (*fertilizing antigen-1*, suatu protein membran plasma spermatozoa) murine. Antibodi FA-1 murine diinduksi pada mencit, selanjutnya diuji dengan teknik fertilisasi *in vitro* pada hewan coba yang sama. Pada kelompok perlakuan ternyata tidak menghasilkan fertilisasi.

Menurut Barber dan Fayrer-Hosken (2000), hewan yang diimunisasi dengan protein zona pelusida, level IgG dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. IgG tersebut akan terikat secara spesifik pada glikoprotein ZP3 oosit. Besarnya angka kegagalan fertilisasi tergantung pada seberapa lengkap antibodi menutup reseptor fertilisasi pada zona pelusida. Hal tersebut sesuai pula dengan kenyataan bahwa uji bahan imunokontrasepsi baik *in vivo* maupun *in vitro* bersifat *dose dependent*. Imunisasi mencit (*Mus musculus*) dengan protein gZP3, membuktikan bahwa semakin tinggi dosis imunogen yang disuntikkan, menghasilkan titer antibodi serum hewan coba lebih tinggi dan menyebabkan angka kegagalan kebuntingan yang lebih tinggi

(Mustofa dkk, 2004a). Pada pengujian secara *in vitro*, Jewgenow *et al* (2000) membuktikan bahwa lebih tinggi kadar serum anti ZP3 yang disuplementasikan pada media fertilisasi oosit dengan spermatozoa kucing, menghasilkan kegagalan fertilisasi yang lebih tinggi.

Pada Penelitian III ini, pemblokian antibodi gZP3 pada ZP3 mencit lebih efektif dibandingkan pemblokian antibodi gZP3 pada ZP3 kambing sendiri (Penelitian II), karena jumlah reseptor fertilisasi pada zona pelusida mencit lebih sedikit daripada jumlah reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing. Berdasarkan teknik *Binding assay*, Zona pelusida mencit secara normal hanya mampu mengikat antara $17,7 \pm 2,5$ spermatozoa (Rankin *et al*, 1998) sampai dengan 42 spermatozoa (Naz dan Zhu, 1998) per satuan zona pelusida. Sedangkan zona pelusida kambing secara normal mampu mengikat sebanyak $123 \pm 14,76$ spermatozoa per satuan oosit (Hemachand *et al*, 2000). Data tersebut memberikan gambaran bahwa dibutuhkan lebih sedikit antibodi gZP3 untuk memblok seluruh reseptor fertilisasi pada zona pelusida mencit (mZP3) dibanding memblok seluruh reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing (gZP3) pada fertilisasi *in vitro*.

Pada penelitian ini, antibodi gZP3 yang digunakan untuk perlakuan fertilisasi *in vitro* pada oosit mencit juga berasal dari serum mencit. Imunisasi mencit dengan protein gZP3 menghasilkan sejumlah klon IgG terhadap epitop-epitop spesifik gZP3. Zhu dan Naz (1999) menyebutkan terdapat homologi yang luas susunan asam amino ZP3 antar spesies pada mamalia. Susunan asam

amino gZP3 sampai saat ini belum selesai dikerjakan, dan belum ada publikasi dari pihak lain. Publikasi yang ada adalah susunan asam amino hZP3 dan mZP3 (Lampiran 10). Berdasarkan pengenalan protein gZP3 oleh serum mencit betina kontrol pada uji Elisa yang telah dibahas sebelumnya, diyakini terdapat homologi susunan asam amino gZP3 dengan susunan asam amino mZP3. Homologi susunan asam amino ZP3 antara dua spesies tersebut menyebabkan beberapa klon IgG hasil imunisasi mencit dengan protein gZP3 tepat mengenali epitop reseptor fertilisasi pada ZP3 mencit (mZP3).

Pada saat dilakukan imunisasi pada mencit betina, beberapa epitop protein gZP3 yang homolog dengan protein epitop mZP3 berinteraksi secara langsung dengan beberapa klon IgG dan dengan sel-sel memori. Sel memori sensitif terhadap rangsangan oleh imunogen yang sama. Reaksi tersebut menyebabkan proliferasi cepat sel-sel memori menjadi sel plasma penghasil antibodi. Menurut Goldsby *et al* (2000), respon imun yang terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas yang tinggi, serta dengan spesifisitas yang luas. Menurut Smith (1999), dalam keadaan spesifisitas yang luas atau spesifisitas terhadap tiap satuan epitop yang tidak sama, menghasilkan sensitivitas yang tinggi. Populasi antibodi yang memiliki keragaman tinggi menunjukkan adanya beberapa klon antibodi dengan afinitas yang berbeda-beda. Klon antibodi dengan afinitas yang tinggi cenderung mendominasi klon antibodi dengan afinitas rendah, sehingga dapat mendominasi spesifisitas.

Uji *dot blot* protein gZP3 terhadap serum hasil imunisasi mencit dengan gZP3 (Penelitian I) menghasilkan gradasi warna dengan intensitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan serum hasil imunisasi protein gZP3 pada kelinci (Gambar 5.9). Hal tersebut memberikan gambaran terdapat lebih banyak ragam klon IgG anti gZP3 asal serum mencit yang terikat pada protein gZP3 dibandingkan jumlah ragam klon IgG anti gZP3 asal serum kelinci. Adanya lebih banyak ragam klon IgG yang mengenali epitop reseptor fertilisasi pada mZP3 dengan afinitas yang lebih tinggi memberikan lebih banyak pilihan klon IgG untuk menghasilkan pemblokkan reseptor fertilisasi yang lebih efektif.

Menurut Goldsby *et al* (2000), kerangka IgG pada *C region* bersifat spesies-spesifik karena terdapat *Hinge region* dan ikatan disulfida untuk mempertahankan struktur IgG, yang juga bersifat spesies-spesifik. Sebagaimana dibahas di atas, diidentifikasi adanya homologi susunan asam amino gZP3 dengan susunan asam amino mZP3. Akibat adanya homologi susunan asam, beberapa klon IgG anti gZP3 asal mencit tersebut, selain memiliki *antigen binding site* yang tepat dengan beberapa epitop ZP3 mencit, juga memiliki struktur dasar kerangka *C region* yang spesifik terhadap ZP3 mencit. Dalam keadaan demikian ikatan antara antibodi gZP3 dengan ZP3 pada oosit mencit tidak perlu mengalami pergeseran *hinge region* melalui mekanisme pergeseran ikatan disulfida. Hal ini berarti beberapa klon IgG anti gZP3 tersebut memiliki afinitas dan aviditas yang tinggi terhadap reseptor fertilisasi mencit (mZP3), sehingga mencegah terjadinya fertilisasi.

6.3.2 Uji Potensi Imunokontraseptif gZP3 dengan Teknik *Binding Assay* pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model

Binding assay merupakan bioassay fungsi ikatan spermatozoa dengan zona pelusida khususnya komponen glikoprotein zona pelusida sebagai *sperm receptor* terhadap *egg binding protein* pada membran plasma spermatozoa. (Franken *et al*, 1991), Berdasarkan hal tersebut, maka *Binding assay* dapat digunakan untuk menguji antifertilitas pada pengembangan metode kontrasepsi (Franken *et al*, 1993). Pada prakteknya, *Binding Assay* dapat digunakan menguji antibodi dalam penelitian imunokontrasepsi menggunakan bahan berbasis ZP3 (Naz *et al*, 2000 ; Govind *et al*, 2000 ; dan Hasegawa *et al*, 2002). Sebagai kontrol internal antara kontrol dan perlakuan pada *Binding assay* dipakai oosit yang berasal dari individu yang sama.

Binding Assay adalah uji yang identik dengan *Hemizona assay* (HZA) pada program fertilisasi *in vitro* (Program Bayi Tabung) pada manusia. *Hemizona assay* merupakan tolok ukur untuk menguji kemampuan ikatan spermatozoa pada zona pelusida (WHO, 1992) sehingga dapat dipakai untuk memprediksi keberhasilan fertilisasi *in vitro* (Franken *et al*, 1993), khususnya untuk mengidentifikasi adanya defek pada ikatan spermatozoa pada zona pelusida (Oehninger *et al*, 1991). Pada membran plasma spermatozoa mencit (*Mus musculus*) terdapat β 1, 4 – galactosyltransferase (Galtase) yang dapat berikatan dengan glikoprotein (*serin/threonin-O linked N-acetyl galactosamine*) pada zona pelusida-3 mencit (Miller *et al*, 2000). *Hemizona assay* dapat pula

digunakan untuk menguji spesifisitas interaksi antara spermatozoa dengan zona pelusida interspesies (Oehninger *et al*, 1993) dan menguji bahan antifertilitas pada pengembangan metode kontrasepsi (Franken *et al*, 1993).

Oosit untuk HZA dapat menggunakan oosit *immature* (oosit stadium profase I), *pre ovulatory oocyte* (metafase II) maupun oosit sisa fertilisasi *in vitro*, yaitu oosit yang belum diinseminasi maupun oosit yang telah diinseminasi tetapi gagal fertilisasi. Oosit yang telah berhasil dibuahi namun gagal berkembang tidak dapat dipakai untuk uji HZA. Sebagai kontrol internal pada pelaksanaan HZA, oosit dibelah menjadi dua bagian, separuh untuk uji kapasitas ikatan pada perlakuan dan separo yang lain untuk kontrol (Oehninger *et al*, 1993).

Uji spesifisitas interspesies menunjukkan terdapat *high species specificity* dalam ikatan spermatozoa pada oosit dan reaksi akrosom pada sel spermatozoa. Spermatozoa dan zona pelusida homolog menghasilkan angka ikatan dan reaksi akrosom yang sangat tinggi, sedangkan pada spesies yang heterolog sangat rendah. Hemi zona manusia dapat mengikat $93,2 \pm 15,8$ spermatozoa manusia, namun hanya dapat mengikat $3,9 \pm 1,3$ spermatozoa kera Makaka. Sebaliknya hemi zona kera Makaka dapat mengikat $126 \pm 34,8$ spermatozoa kera Makaka, tetapi hanya dapat mengikat $2,8 \pm 1,6$ spermatozoa manusia (Oehninger *et al*, 1993). Ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida bersifat irrevesible dan spesifik (Franken *et al*, 1991). Oleh karena itu uji hambatan ikatan spermatozoa dengan zona pelusida homolog dapat dipakai

untuk mengetahui potensi imunokontraseptif dengan target zona pelusida atau membran plasma spermatozoa.

Pada penelitian ini, oosit yang diinkubasi dengan 10 % *pre immune serum* dengan titer 40 menghasilkan rerata jumlah sel spermatozoa terikat sebesar $35,1 \pm 3,35$ dengan rentangan antara 33 – 43. Angka ini lebih besar dari laporan Rankin *et al* (1998) bahwa pada kelompok kontrol zona pelusida mencit dapat mengikat $17,7 \pm 2,5$, namun sedikit lebih kecil dibandingkan laporan Naz dan Zhu (1998) yang menghasilkan jumlah spermatozoa terikat sebanyak 42 per satuan oosit. Pada oosit yang diinkubasi dengan 10 % *post immune serum* dengan titer 640, jumlah sel spermatozoa yang terikat kuat antara 0 – 4 dengan rerata $1,90 \pm 1,25$ (Gambar 5.14.). Berdasarkan data tersebut dapat dihitung *Binding Index* hasil penelitian ini. *Binding Index* adalah jumlah sel spermatozoa terikat pada zona pelusida perlakuan dibagi jumlah spermatozoa terikat pada zona pelusida kontrol dikalikan 100, dalam skala 0 – 100 (Govind *et al*, 2000 ; Naz *et al*, 2000). *Binding Index* pada penelitian ini adalah sebesar $5,45 \pm 3,88$ dengan rentangan antara 0 – 11,76 (Gambar 5.15.). Hasil di atas menunjukkan bahwa antibodi gZP3 dapat menurunkan peluang terikatnya spermatozoa pada zona pelusida, sehingga menimbulkan penurunan angka fertilisasi. Hasil penelitian tersebut sesuai dengan laporan Paterson *et al* (2002) yang membuktikan bahwa antibodi ZP3 homolog maupun heterolog dapat menurunkan *human sperm – egg binding* lebih dari 60 %. Hasil *Binding Index* tersebut pada penelitian ini analog dengan laporan Hasegawa *et al* (2002)

menunjukkan bahwa peptida *anti-human* dan *anti-rabbit* juga menyebabkan jumlah spermatozoa yang terikat pada oosit lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Govind *et al* (2000) menggunakan tolok ukur *Hemi Zona Index* untuk menguji ikatan *human sperm - human zona pellucida*. *Hemi Zona Index* dihitung dengan cara yang sama dengan *Binding Index* (WHO, 1992). Suplementasi 10 % antibodi monoklonal MA-813 dengan titer 39.000 dalam media mendapatkan angka *Hemi Zona Index* sebesar 19,0.

Kegagalan fertilisasi akibat pemakaian imunokontrasepsi berbasis protein ZP3 adalah karena tertutupnya secara sterik reseptor fertilisasi oleh antibodi ZP3. Antibodi ZP3 terikat pada *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc pada ZP3, sehingga menghalangi terikatnya spermatozoa (Kerr *et al*, 1998 ; Hasegawa *et al*, 2000). Kalaupun terjadi pengenalan yang dilanjutkan terikatnya beberapa sel spermatozoa pada zona pelusida, belum tentu akan menghasilkan fertilisasi. Pada sel telur yang gagal dibuahi oleh spermatozoa dijumpai beberapa sel spermatozoa terikat kuat pada zona pelusida sel telur tersebut. Pada saat spermatozoa terikat pada zona pelusida, $\beta 1,4$ – *galactosyltransferase* (Galtase), sebagai ligan pada sel spermatozoa terikat pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ – GalNAc, reseptor ovum pada ZP3 (Bazer *et al*, 2000 ; Van den Steen *et al*, 1998). Ikatan tersebut akan menginduksi terjadinya serangkaian proses reaksi akrosom untuk terjadinya fertilisasi selengkapnya (Miller *et al*, 2002). Dengan adanya antibodi gZP3 yang terlebih dahulu terikat secara sterik pada *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – $\beta(1,3)$ –

GalNAc pada mZP3, menyebabkan ikatan Galtase –GalNAc tersebut tidak sempurna, sehingga gagal menginduksi spermatozoa untuk melakukan reaksi akrosom. Kegagalan reaksi akrosom mengakibatkan spermatozoa tersebut tidak mampu melanjutkan kesinambungan proses fertilisasi.

Protein gZP3, setelah melewati serangkaian uji lanjutan, di masa depan diharapkan dapat diterapkan sebagai bahan kontrasepsi pada wanita. Agar kandidat bahan imunokontrasepsi yang berasal dari gZP3 ini mempunyai spesifisitas yang tinggi maka harus diketahui terlebih dahulu susunan asam amino untuk menemukan epitop spesifiknya. Selanjutnya, karena respon imun terpenting yang diharapkan dari imunokontrasepsi adalah respon imun humoral, yaitu respon imun yang didominasi oleh reaksi sel B, maka perlu dilakukan penelitian untuk menemukan epitop sel B pada protein gZP3 yang homolog dengan susunan asam amino ZP3 manusia (*Homo sapiens*) (Lampiran 10.1).

Diantara hewan mamalia, primata diketahui mempunyai siklus reproduksi dan siklus birahi yang mirip dengan siklus menstruasi pada wanita. Pengujian lebih lanjut peptida dimaksud di atas perlu dilakukan pada primata dengan pengamatan pada infertilitas, masa kembalinya kesuburan, dan efek samping pada siklus birahi maupun kelainan pada histologi ovarium. Berdasarkan peptida tersebut di atas juga dapat diproduksi antibodi monoklonal dan mengujinya dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay* guna mewujudkan penerapannya sebagai bahan kontrasepsi alternatif pada wanita di masa depan.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan :

Berdasarkan hasil-hasil penelitian eksploratif laboratorik dan penelitian eksperimental yang telah dilakukan di atas, yaitu :

- 7.1.1 Identifikasi, isolasi dan karakterisasi reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing (*goat zona pellucida, gZP*), disimpulkan bahwa :
- a. Zona Pelusida Kambing terdiri dari tiga konstituen, yaitu gZP1, gZP2, dan gZP3 dengan massa molekul relatif (Mr) berturut-turut 120, 94, dan 82 kDa, serta proporsi massa berturut-turut 6,93 %, 29,60 % dan 63,47 %. Analisis *Dot Blotting* menunjukkan bahwa antibodi gZP3 asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan dikenali oleh isolat protein gZP3 dengan intensitas lebih pucat dibanding antibodi gZP3 asal serum mencit (*Mus musculus*) betina.
 - b. Analisis imunofluoresen menunjukkan bahwa isolat protein gZP3 merupakan reseptor yang dapat dikenali oleh membran plasma spermatozoa kambing. Antibodi gZP3 asal mencit (*Mus musculus*) dapat mengenali homogenat zona pelusida kambing, dan isolat protein gZP3 dapat mengenali membran plasma spermatozoa kambing.

7.1.2 Isolat protein gZP3 penelitian ini merupakan reseptor fertilisasi kambing. Dalam uji *binding* antibodi dan protein reseptor fertilisasi pada zona pelusida kambing (gZP3) dengan teknik fertilisasi *in vitro* disimpulkan bahwa :

- a. Antibodi gZP3 asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan yang disuplementasikan pada media maturasi *in vitro* oosit kambing menghambat fertilisasi, sehingga menurunkan secara nyata ($p < 0,05$) angka *cleavage*.
- b. Isolat protein gZP3 yang disuplementasikan pada media kapasitas spermatozoa kambing menghambat fertilisasi secara *in vitro*, sehingga menurunkan secara nyata ($p < 0,05$) angka *cleavage*.

7.1.3 Protein gZP3 bersifat imunokontraseptif pada hewan coba model. Dalam uji potensi imunokontraseptif antibodi gZP3 dengan teknik fertilisasi *in vitro* pada oosit mencit (*Mus musculus*) sebagai model menunjukkan bahwa :

- a. Antibodi gZP3 asal mencit (*Mus musculus*) betina menghambat secara nyata ($p < 0,05$) fertilisasi oosit mencit secara *in vitro*.
- b. Antibodi gZP3 asal mencit (*Mus musculus*) betina menghambat pengenalan spermatozoa terhadap oosit mencit (*Mus musculus*) sehingga menurunkan secara nyata ($p < 0,05$) *Binding Index*.

7.2 S a r a n : Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk :

- 7.2.1 Menemukan susunan asam amino gZP3 yang homolog dengan susunan asam amino ZP3 manusia (*Homo sapiens*) dan menguji potensi immunokontrasptif peptida tersebut pada primata dengan pengamatan pada efek utama pada infertilitas dan efek samping pada siklus menstruasi dan perubahan histologi ovariumnya.
- 7.2.2 Menguji peptida tersebut di atas dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay*.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 2003. Cellular and Molecular Immunology 5th Ed. WB Saunders. Pp : 233 – 291.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Martin R, Roberts K, and Walter P. 2002. Molecular Biology of The Cell 4th Ed. Garland Science, New York. Pp : 1151.
- Aulanni'am, 2003. Pengembangan vaksin imunokontrasepsi wanita melalui pemanfaatan *bovine* zona pellucida 3 deglycosylated. Seminar Nasional Aplikasi Biologi Molekuler Di Bidang Veteriner Dalam Menunjang Pembangunan Nasional. Surabaya, 1 Mei 2003.
- Aulanni'am, Sumitro SB, Hardjopranto S, Sutiyoso, and Soendoro T. 2003. Bovine Zona Pellucida 3 Deglycosylated (bZP3dG) and The Prospect for Immunocontraceptive Vaccine. Media Kedokteran Hewan 19 (3) : 117-120.
- Aulanni'am, 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Hal 58.
- Austyn JN and Wood KJ, 2000. Principle of cellular and molecular immunology. Oxford : Oxford University Press, Pp 39-46.
- Badan Koordinasi Keluarga Berencana Nasional (BKKBN), 2002. Umpan balik hasil pencapaian program Keluarga Berencana Nasional. Diterbitkan oleh BKKBN Pusat. Hal 8-9.
- Baird DT and Glasier AF. 1999. Clinical review : Science, medicine, and the future Contraception. BMJ 319 : 969-972.
- Barber MR and Fayrer-Hosken RA, 2000. Possible mechanisms of mammalian immunocontraception. J Reprod Immunol 46 : 103-124.
- Bazer FW, Geisert RD, and Zavy MT, 2000. Fertilization, cleavage and implantation. In : Hafez, E.S.E. (Ed). Reproduction in Farm Animals. 7th Ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, Pp. 13-16, 68-79.
- Beesley JE. 1993. Immunocytochemical Avenues, In : Beesley JE (Ed), Immunocytochemistry, A Practical Approach. Oxford University Press, Pp : 7-13.

- Boja ES, Hoodbhoy T, Fales HM and Dean J. 2003. Structural characterization of native mouse zona pellucida proteins sing mass spectrometry J. Biol. Chem. 278 (36) : 34189-34202.
- Bradley MP, Eade J, Penhale J, and Bird PJ, 1999. Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species. Biotechnol 20 ; 73(2-3):91-101.
- Brewis IA and Wong CH, 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. J. Reprod and Fertil 4 : 135–142.
- Burgess GW, 1995. Teknologi Elisa Dalam Diagnosis Dan Penelitian. Penerjemah : Wayan T. Artama. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta Hal. 56-69.
- Carmona E, Weerachayanukul W, Soboloff T, Fluharty AL, White D, Promdee L, Ekker M, Berger T, Buhr M, and Tanphaichitr N, 2002. Arylsulfatase A is present on the pig sperm surface and is involved in sperm–zona pellucida binding. Develop Biol 247 : 182–196.
- Dale B and Elder K. 2000. Sperm – Oocyte Interaction, In : In vitro fertilization. Cambridge University Press. P : 42.
- De Maio A. 1994. Protein Blotting and Immunoblotting Using Nitrocellulose Membrane, In : Dunbar BS (Ed), Protein Blotting, A Prctical Approach. Oxford University Press, Pp : 11-29.
- Dunbar BS, Lo CL, Powell J and Stevens VC, 1989. Use of a synthetic peptide adjuvant for the immunisation of baboons with denatured and deglycosylated pig zona pellucida glycoproteins. Fertil Steril 52 : 311–318.
- Fayrer-Hosken RA, Bertschinger HJ, Kirkpatrick JF, Grobler D, Lamberski N, Honneyman G, and Urlich T, 1999. Contraceptive potential of porcine zona pellucida vaccine in the African elephant (*Loxodonta africana*). Theriogenology 52 (5) : 835-46.
- Franken DR, Windt ML, Kruger TK, Oehninger S and Hodgen GD, 1991. Comparison of Sperm *Binding* Potential of Uninseminated, Inseminated-unfertilized, and Fertilized-Noncleaved Human Oocyte Under Hemizona Assay Conditions. Mol Reprod and Development 30 : 56-61.
- Franken DR, Kruger TK, Oehninger S, Coddington CC, Lombart C, Smith K and Hodgen GD, 1993. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive in-vitro fertilization cycles. Hum Reprod 8(8) : 1240-1244.

- Goldsby RA, Kindt TJ and Osborne BA, 2000. *Kuby immunology*. 4th Ed. New York : W.H. Freeman and company, Pp 10-15.
- Gopalakrishnan B and Shaha C. 1998. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Letters* 422 : 296 – 300.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge University Press, Cambridge. Pp : 231-233.
- Govind CK, Hasegawa A, Koyama K, and Gupta SK, .2000. Delineation of a conserved B cell epitope on Bonnet monkey (*Macaca radiata*) and human zona pellucida glycoprotein-B by monoclonal antibodies demonstrating inhibition of sperm-egg binding. *Biol Reprod* 62 : 67–75.
- Green DL, 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *J. Reprod and Fertil* 2 : 147–156.
- Greenhouse S, Castle PE, and Dean J, 1999. Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucidae. *Hum Reprod* 1999 Mar ; 14(3):593-600.
- Hafez ESE and Hafez B. 2000. Fertilization and Cleavage. In : Hafez ESE (Ed). *Reproduction in farm animals*. 7th Ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins. Pp 110-125.
- Hardy CM, ten Have JF, Pekin J, Beaton S, Jackson RJ, and Clydesdale G. 2003. Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse zona pellucida subunit 3 (mZP3) proteins. *Reproduction*.126(1):49-59.
- Harris, J.D., Hibler, D.W., Fontenot, G.K., Hsu, K.T., Yurewicz, E.C. and Sacco, A.G. 1994. Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families. *J DNA Seq.* 4 (6) : 361-393.
- Harris JD, Seid CA, Fontenot GK, and Liu HF, 1999. Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif* 1999 Jul;16(2):298-307.
- Hartanto H, 2002. *KB, Keluarga Berencana dan Kontrasepsi*. Jakarta : Pustaka Sinar Harapan, Hal 14-15, 36-41.

- Hasegawa A, Tsubamoto H, Hamada Y, and Koyama K. 2000. Blocking effect of antisera to recombinant zona pellucida proteins (r-ZPA) on in vitro fertilization. *Am J Reprod Immunol* 44(1):59-64.
- Hasegawa A, Hamada Y, Shigeta M, and Koyama K, 2002. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA). *J Reprod Immunol* 53 : 91-98.
- Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM and Shaha C, 2002. Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *J. Cell Sci* 115 (10) : 2053-2065.
- Henderson CJ, Hulme MJ and Aitken RJ, 1987a. Analysis of the biological properties of antibodies raised against intact and deglycosylated porcine zona pellucidae. *Gamete Res* 16 : 323-34.
- Henderson CJ, Braude P and Aitken RJ, 1987b. Polyclonal antibodies to a 32-kDa deglycosylated polypeptide from porcine zonae pellucidae will prevent human gamete interaction in vitro. *Gamete Res.* 18 : 251-265.
- Jewgenow K, Rohleder M and Wegner I. 2000. Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J Reprod and Fertil* 119 : 15-23.
- Kerr LE, Paterson M and Aitken RJ, 1998. Molecular basis of sperm – egg interaction and the prospect for immunocontraception. *J Reprod Immunol.* 40 : 103-118.
- Kiernan JA. 1990. Immunohistochemistry and Other Methods Based on Affinity. In : Kiernan JA (Ed), *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. Pergamon Press. Oxford. Pp. : 337-338.
- Jones, W.R. 1996. Contraceptive vaccines. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1996 Apr;10(1):69-86.
- Kaul, R., A. Afzalpurkar, and S.K. Gupta. 1996. Strategies for designing an immunocontraceptive vaccine based on zona pellucida synthetic peptides and recombinant antigen. *J Reprod Fertil Suppl* 1996;50:127-34.
- Lee EB and Chi HC, 1985. Female infertility evaluation of natural products. Proceeding from the UNESCO Regional Workshop. Seoul, Pp 18-22.
- Lindau - Shepard B, Brumberg HA, Peterson AJ, and Dias JA, 2001. Reversible immunoneutralization of human follitropin receptor. *J Reprod Immunol* 49 (1) : 1-19.

- Mahaputra L, Hinting A, Hermadi AH, Mustofa I, Utama S, dan Srianto P. 1992. Pembuatan Embrio Beku, Kembar Identik dan Viabilitasnya dalam Upaya Merintis Pembangunan Banj Embrio, Sub : Fertilisasi *in vitro* pada Sapi Madura. Penelitian Hibah Bersaing II/1. Ditjendikti Depdiknas.
- Mahaputra L, Hinting A, Mustofa I, dan Utama S. 1998. Aplikasi Transfer Embrio Beku Hasil Fertilisasi *in vitro* untuk Membuat Kebuntingan Kembar Fraternal pada Resipien Sapi Friesian Holstein. JPUA 6(2) : 43-48.
- Mahaputra L dan Mustofa I. 1999. Pembuatan Kembar Identik Sapi Madura dengan Teknik Pembuahan *in vitro* dan Penyayatan Embrio pada Sapi Friesian Holstein Penerima. Media Veteriner 6(2) : 5-10.
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2000. Pemanfaatan teknologi bayi tabung untuk mengembangkan bank embrio sapi Madura. Media Kedokteran Hewan. 16(3) : 17-20.
- Mahaputra L dan Mustofa I. 2001. Pengaruh Beberapa Perlakuan Semen Sapi Madura terhadap Persentase Hidup, Motilitas Spermatozoa dan Angka Cleavage. Media Kedokteran Hewan 17(3) : 151-153.
- Mahaputra L dan Mustofa I, 2002. Kinerja Serum Sapi Birahi dan kuda Birahi sebagai Suplemen Media Maturasi Oosit pada Fertilisasi *in vitro* Sapi Madura. Jurnal Biosains Pascasarjana 4(3) :113-117.
- Martinez ML and Harris JD, 2000. Effectiveness of zona pellucida protein ZPB as an immunocontraceptive antigen. J Reprod Fertil 120 (1) : 19-32.
- McCartney CA and Mate KE, 1999. Cloning and characterisation of a zona pellucida 3 cDNA from a marsupial, the brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. Zygote 7 (1) : 1-9.
- Miletich JP and Broze GJ, 1990. Protein is not glycosylated at asparagine 329. J. Biol. Chem. 329 : 11397-11404.
- Miller LA, Johns BE, Elias DJ and Killian GJ,. 1999. Oral vaccination of white-tailed deer using a recombinant *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine expressing the *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A: prospects for immunocontraception. Am J Reprod Immunol 41 : 4279-85
- Miller DJ, Gong X and Shur BD, 2000. Sperm require -N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. Development 118 : 1279-1289.

- Miller DJ, Shi X, and Burkin H. 2002. Molecular basis of mammalian gamete binding. *RPHR* 57 : 37-73.
- Mustofa I, Mahaputra L dan Utama S. 1999. Identifikasi Kinerja Bahan Bioaktifserum Sapi dan Kuda Birahi sebagai Suplemen Media Kultur Fertilisasi *in vitro* untuk Meningkatkan Perolehan Embrio Sapi Madura. Laporan Penelitian Dasar, Ditjendikti, Depdiknas.
- Mustofa I, Istianah F, Rinawati DS, dan Kurniawati A, 2001. Pengaruh imunisasi mencit (*Mus musculus*) betina terhadap angka kebuntingan, jumlah janin, siklus birahi dan gambaran histologis ovarium. *Unpublished Data*.
- Mustofa I, Mahaputra L, Rantam FA dan Hinting A. 2003. Pembakuan Epitop Reseptor Spermatozoa pada Zona Pelusida Kambing sebagai Bahan Dasar Pengembangan Vaksin Kontrasepsi Masa Depan. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/1. Ditjen Dikti Depdiknas.
- Mustofa I, Mulyati S dan Mahaputra L. 2004a. Pengaruh Imunisasi dengan Zona Pelusida-3 Kambing terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Anak pada Mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan* 20(1) : 22-25.
- Mustofa I, Mahaputra L, Rantam FA dan Hinting A. 2004b. Pembakuan Epitop Reseptor Spermatozoa pada Zona Pelusida Kambing sebagai Bahan Dasar Pengembangan Vaksin Kontrasepsi Masa Depan. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XI/2. Ditjen Dikti Depdiknas.
- Mustofa I. 2005. Identifikasi Efek Samping Imunokontrasepsi Zona Pelusida - 3 Kambing pada Histologi Ovarium Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model. *Media Kedokteran Hewan*. 21(1) : 19 – 22.
- Naz RK and Zhu X, 1998. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* 59 : 1095–1100.
- Naz RK, 2000. Fertilization related sperm antigens and their immunocontraceptive potentials. *Am J reprod Immunol* 44 (1) : 41-6.
- Naz RK, Sacco A, Singh O, Pal R, and Talwar GP. 2000. Development of contraceptive vaccines for humans using antigens derived from gametes (spermatozoa and zona pellucida) and hormones (human chorionic gonadotrophin): current status. *Hum Reprod Update* 1995 Jan;1(1):1-18 .
- Oehninger AA, Acosta LL, Veeck R, Brzyski TF, Kruger SJ, Muasher and Hodgen GD, 1991. Recurrent failure of in vitro fertilization : Role of the

- hemizona assay in the sequential diagnosis of specific sperm – oocyte defects. *Am J Obstet Gynecol* 164 : 1210 - 5.
- Oehninger S, Mahony MC, Swanson JR and Hodgen GD, 1993. The specificity of human spermatozoa/zona pellucida interaction under hemizona assay condition. *Mol Reprod and Development* 35 : 57-61.
- Paterson M, Koothan PT, Morris KT, O'Byrne KT, Braude P, Williams A, and Aitken RJ, 1992. Analysis of the contraceptive potential of antibodies against native and deglycosylated porcine ZP3 in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 46 : 523–534.
- Paterson M, Wilson MR, Jennings ZA, van Duin M and Aitken RJ, 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol Hum Reprod* 5 (4) : 342-52.
- Paterson M, Jennings ZA, van Duin M, and Aitken RJ, 2000. Immunocontraception with zona pellucida. *Cells tissue organs* 166 (2) : 228-32.
- Paterson M, Jennings ZA, Wilson MR and Aitken R, 2002. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol* 53 : 99–107.
- Pineda MH, 2003. Female Reproduction System. In : Pineda MH (Editor). *McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction*. 5th Ed. Iowa State Press. Iowa. Pp: 283 – 340.
- Ramalho-Santos JA, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, and Schatten G, 2000. SNAREs in mammalian sperm : possible implications for fertilization. *Developmental Biology* 223 : 54–69.
- Rankin TL, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H and Dean J. 1996. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* (122) : 2903-2910.
- Rankin TL, Tong Z, Castle PE, Lee E, Gore-Langton R, Nelson LM and Dean J. 1998. Human ZP3 restores fertility in Zp3null mice without affecting order-specific sperm binding. *Development* (125) : 2415-2424
- Rankin T and Dean J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod*. 5 (2) : 114-21.

- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J and Dean J, 2001. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128 : 1119-1126
- Rantam FA. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya. Hal 79-80, 125-128, 147-153.
- Restiadi TI. 2001. Pengaruh Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) pada Maturasi dan fertilisasi *in vitro* Oosit Kambing Lokal. *Media Kedokteran Hewan* 16 (1) : 25-30.
- Sadler K, Bird PH, Brown LE, and Jackson DC. 2000. The antigenic and immunogenic properties of synthetic peptide immunocontraceptive vaccine candidates based on gamete antigens. *Vaccine* 18 : 416-425.
- Santosa S, 2001. *Buku pelatihan SPSS statistik parametrik*. Jakarta : PT Elex Media Komputindo, Hal 56-70.
- Schorderet SS and Huarte J. 2003. Gametogenesis and Gamete Interactin during Fertilization. *Reprod Health* 3 (6) : 72-79.
- Skinner SM, Schwoebel ES, Prasad SV, Oguna M and Dunbar BS, 1999. Mapping of dominant B-cell epitopes of a human zona pellucida protein (ZP1). *Biol Reprod* 61 (6) : 1373-80.
- Smith 1995. *Produksi Serum Hiperimun, dalam : Burgess GW (Ed). Teknologi Elisa Dalam Diagnosis Dan Penelitian*. Penerjemah : Wayan T. Artama. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta Hal. 15-32.
- Srivastava NR, Santhanam P, Sheela S, Mukund SS, Thakral BS, Malik and Gupta SK, 2002. Evaluation of the immunocontraceptive potential of *Escherichia coli*-expressed recombinant dog ZP2 and ZP3 in a homologous animal model. *Reproduction* 123 : 847-857.
- Steel RGD and Torrie JH, 1993. *Principles and procedures of statistics*. Terjemahan Bambang Sumantri. Jakarta : Penerbit Gramedia Pustaka Utama, Hal 105-116, 139-146, 565-570.
- Sumitro SB and Aulanni'am. 2001. Zona pellucida 3 (ZP3) has proper biochemical properties to be considered as candidate antigen for immunocontraceptive vaccine. *Reprotech* 1(1) : 51-53.
- Takasaki S, Mori E, and Mori T, 1999. Structures of sugar chains included in mammalian zona pellucida glycoproteins and their potential roles in

- sperm-egg interaction *Biochimica et Biophysica Acta*. 1473 (1999) 206 - 215.
- Talbot P, Shur BD and Myles DG. 2003. Cell Adhesion and Fertilization: Steps in Oocyte Transport, Sperm-Zona Pellucida Interactions, and Sperm-Egg Fusion. *Biol Reprod* 68 : 1–9.
- Thaler, C.D. and R.A. Cardullo. 1996. Distinct Membrane Fractions from Mouse Sperm Bind Different Zona Pellucida Glycoproteins. *Biology of Reproduction* 66 : 65-69.
- Tsubamoto H, Yamasaki N, Hasegawa A, and Koyama K. 1999. Expression of a recombinant porcine zona pellucida glycoprotein ZP1 in mammalian cells. *Protein Expr Purif* 17(1) : 8-15.
- Utama S, Mustofa I, Mahaputra L dan Simorangkir D, 2002. Pembuatan embrio kembar empat dan kembar delapan untuk mempercepat peningkatan populasi sapi Madura. Penelitian Hibah Bersaing VII/2 Ditjendikti Depdiknas.
- Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA and Opdenakker G, 1998. Concept and principles of O-linked glycosylation. *Biochem Mol Biol* 33(3) : 151 – 208.
- Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol.* 3 (2) : 59-64.
- Wassarman PM. 2002. Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med.* 69(3) : 148-155.
- World Health Organisation (WHO). 1992. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3rd edition. Cambridge University Press.
- Yonezawa N, Fukui N, Kuno M, Shinoda M, Goko S, Mitsui S, and Nakano M. 2001. Molecular cloning of bovine zona pellucida glycoproteins ZPA and ZPB and analysis for sperm-binding component of the zona. *Eur J Biochem.* 268(12) : 3587-94.
- Zara J and Naz RK. 1998. The Role of Carbohydrate in Mammalian Egg Interactions : How Important are Carbohydrate Epitopes ? *Frontiers in Bioscience* 3 : 1028-1038.
- Zhu X and Naz RK. 1999. Comparison of ZP3 protein sequence among vetrebrate species : to obtain a concensus sequence for immunocontraception. *Frontiers in Bioscience* 4 : 212-225.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Mikrobiometri zona pelusida kambing

1.1 Data diameter total oosit, diameter vitelus dan tebal zona pelusida kambing (dalam μm)

No.	Total	Vitelus	Tebal ZP
1.	168	142.8	16.8
2.	188.16	159.6	20.16
3.	201.6	151.2	20.16
4.	201.6	159.6	16.8
5.	184.8	142.8	16.8
6.	201.6	168	16.8
7.	201.6	168	16.8
8.	184.8	151.2	16.8
9.	168	142.8	16.8
10.	188.16	151.2	16.8
11.	184.8	126	13.44
12.	168	142.8	16.8
13.	201.8	134.4	16.8
14.	184.8	142.8	13.44
15.	168	168	16.8
16.	176.4	134.4	16.8
17.	168	134.4	16.8
18.	168	151.2	16.8
19.	184.8	142.8	13.44
20.	184.8	142.8	16.8

1.2 Statistik Deskriptif diameter total oosit, diameter vitelus dan tebal zona pelusida kambing (dalam μm)

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
OOSIT	20	168.00	201.80	183.8860	12.9530
VITELIN	20	126.00	168.00	147.8400	12.0038
ZP	20	13.44	20.16	16.6320	1.7150
Valid N (listwise)	20				

Lampiran 2 Perhitungan massa molekul relatif gZP3 menggunakan persamaan regresi linier

2.1 Data Jarak Masing-masing Band dan Mr High Range SDS-PAGE Marker

Jarak	Rf	MR kDa	MR Da	log MR (y)
4	0.063	200.000	200000	5.301
14	0.222	116.250	116250	5.065
23	0.365	97.400	97400	4.989
37	0.587	66.200	66200	4.821
59	0,937	45.000	45000	4.653

2.2 Analisis Regresi Jarak Masing-masing Band dan Mr High Range SDS-PAGE Marker

Regression Variables Entered/Removed^b

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf ^a		Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log MR (y)

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.975 ^a	.952	.935	.062481

a. Predictors: (Constant), Rf

ANOVA^b

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.230	1	.230	58.871	.005 ^a
	Residual	.012	3	.004		
	Total	.242	4			

a. Predictors: (Constant), Rf

b. Dependent Variable: log MR (y)

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
	B	Std. Error	Beta		
1 (Constant)	5.272	.049		108.161	.000
Rf	-.705	.092	-.975	-7.673	.005

a. Dependent Variable: log MR (y)

2.3 Perhitungan Mr Konstituen-konstituen gZP

Persamaan regresi linier : $y = 5.272 - 0.705 x$.

Konstituen	Ulangan	Rf	Y	Mr (kDa)	X ± SD
gZP1	1	0.3279	5.0575496	114.1695	120,67 ± 6,12
	2	0.3279	5.0575496	114.1695	
	3	0.25	5.09275	123.8083	
	4	0.25	5.09275	123.8083	
	5	0.2333	5.1051915	127.4066	
gZP2	1	0.4344	4.9749056	94.3857	94.38 ± 1.66
	2	0.4344	4.9749056	94.3857	
	3	0.4167	4.9685585	93.0163	
	4	0.4167	4.9685585	93.0163	
	5	0.3917	4.9871835	97.0921	
gZP3	1	0.5492	4.8858208	76.8813	82.05 ± 6.90
	2	0.5409	4.8922616	78.03	
	3	0.5409	4.8922616	78.03	
	4	0.5409	4.8922616	78.03	
	5	0.5409	4.8922616	78.03	
	6	0.431	4.955491	90.2591	
	7	0.431	4.955491	90.2591	
	8	0.431	4.955491	90.2591	
	9	0.431	4.955491	90.2591	
	10	0.431	4.955491	90.2591	
	11	0.55	4.86925	74.0031	
	12	0.55	4.86925	74.0031	
	13	0.5167	4.8940585	78.3536	

2.4 Statistik Deskriptif Mr Konstituen-konstituen gZP

Lampiran 3 Luas Daerah Di Bawah Kurva Densitometri

3.1 Data Luas Daerah Di Bawah Kurva Densitometri

gZP1	gZP2	gZP3
2405.7	11034.5	20723.9
3092.1	10239.1	23282.6
2089.2	10111.8	23542.3
2529	11457.6	24305
2413.4	10710.75	22963.45

3.2 Statistik deskriptif Luas Daerah Di Bawah Kurva Densitometri

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
GZP1	5	2089.20	3092.10	2650.1000	418.8350
GZP2	5	10111.80	11457.60	10710.75	557.6275
GZP3	5	20723.90	24305.00	22963.45	1346.5015
Valid N (listwise)	5				

Lampiran 4 Titer Antibodi Serum Mencit (*Mus musculus*) setelah imunisasi dengan gZP3

4.1 Checker Board Antibodi Mencit

Checker Board (M+)

Pengenceran	OD-1	OD-1	X	Titer
20	1.361	1.340	1.351	320
40	1.061	0.958	1.010	160
80	0.766	0.631	0.699	80
160	0.478	0.431	0.455	40
320	0.301	0.253	0.277	20
640	0.201	0.155	0.178	0
1280	0.109	0.097	0.103	0
2560	0.066	0.057	0.062	0
5120	0.039	0.034	0.037	0
10240	0.027	0.021	0.024	0
20480	0.015	0.012	0.014	0

Checker Board (M-)

20	0.405	0.435	0.420	
40	0.330	0.324	0.327	
80	0.135	0.152	0.144	COV

Negatif Standar = 0.150

Positif bila > 1.5 COV = 0.216

Keterangan :	0.216 - 0.277 = 20
	0.278 - 0.466 = 40
	0.467 - 0.699 = 80
	0.641 - 0.872 = 640
	0.700 - 1.020 = 160
	1.021 - 1.351 = 320
	> 1.352 = 640

4.2 Data Konversi Nilai Optical Density – Titer Antibodi Mencit

No	Kontrol				Perlakuan 40 ug gZP3			
	OD-1	OD-2	Rata-rata	Titer	OD-1	OD-2	Rata-rata	Titer
1	0.424	0.271	0.3475	40	1.652	1.67	1.661	640
2	0.416	0.312	0.364	40	1.589	1.615	1.602	640
3	0.436	0.414	0.425	40	1.608	1.64	1.624	640
4	0.441	0.488	0.4645	40	1.645	1.641	1.643	640
5	0.425	0.421	0.423	40	1.606	1.66	1.633	640
6	0.415	0.302	0.3585	40	1.615	1.676	1.6455	640
7	0.437	0.341	0.389	40	1.601	1.65	1.6255	640
8	0.647	0.538	0.5925	80	1.602	1.67	1.636	640
9	0.43	0.349	0.3895	40	1.64	1.7	1.67	640
10	0.433	0.467	0.45	40	1.63	1.6	1.615	640

4.3 Analisis statistik titer antibodi mencit

T-Test

Group Statistics

TITER	PERLAKUAN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	1	10	44.00	12.65	4.00
	2	10	640.00	.00	.00

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
TITER	Equal variances assumed	5.063	.037	-149.0	18	.00	-596.00	4.00	-604.40	-587.60
	Equal variances not assumed			-149.0	9.00	.00	-596.00	4.00	-605.05	-586.95

Lampiran 5 Titer Antibodi Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3

5.1 Checker Board Antibodi Serum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*)

Checker Board (R+)

Pengenceran	OD	Titer
20	1.532	10240
40	1.537	10240
80	1.508	10240
160	1.437	5120
320	1.314	2560
640	1.074	1280
1280	0.872	640
2560	0.640	320
5120	0.482	160
10240	0.346	80
20480	0.240	0
40960	0.192	0

R - : Pengenceran 20 = 0.324
 40 = 0.163 COV
 Negatif Standar = 0.150
 Positif bila > 1.5 COV = 0.245

Keterangan :

0.245 - 0.346 = 80
0.347 - 0.482 = 160
0.483 - 0.640 = 320
0.641 - 0.872 = 640
0.873 - 1.074 = 1280
1.075 - 1.314 = 2560
1.315 - 1.437 = 5120
1.438 - 1.537 = 10240
> 1.538 = 20480

5.2 Data Konversi Nilai Optical Density – Titer Antibodi Kelinci

Identitas	OD-1	OD-1	Rata-2	Titer
R-1	0.082	0.084	0.083	0
R-2	0.053	0.059	0.056	0
R-3	0.117	0.104	0.111	0
R-4	0.083	0.092	0.088	0
R-5	0.082	0.086	0.084	0
R-6	0.078	0.080	0.079	0

R-7	0.111	0.065	0.088	0
R-8	0.110	0.048	0.079	0
R-9	0.104	0.092	0.098	0
R-10	0.098	0.086	0.092	0
R-11	0.056	0.104	0.080	0
R-12	0.056	0.098	0.077	0
R-13	0.056	0.092	0.074	0
R-14	0.055	0.086	0.071	0
R-15	0.053	0.080	0.067	0
R-16	0.048	0.065	0.057	0
R-17	1.456	1.476	1.466	10240
R-18	1.372	1.372	1.372	5120
R-19	1.373	1.432	1.403	5120
R-20	1.305	1.276	1.291	2560
R-21	1.391	1.390	1.391	5120
R-22	1.388	1.466	1.427	5120
R-23	1.465	1.440	1.453	10240
R-24	1.447	1.485	1.466	10240
R-25	1.430	1.394	1.412	5120
R-26	1.453	1.453	1.453	10240
R-27	1.430	1.430	1.430	5120
R-28	1.512	1.512	1.512	10240
R-29	1.468	1.468	1.468	10240
R-30	1.526	1.526	1.526	10240
R-31	1.492	1.492	1.492	10240
R-32	1.527	1.527	1.527	10240

5.3 Data Titer Antibodi Kelinci

Pengambilan ke-	Kelinci	Pre Imun	Post Imun
1	R-1	0	R-17 10240
	R-2	0	R-18 5120
2	R-3	0	R-19 5120
	R-4	0	R-20 2560
3	R-5	0	R-21 5120
	R-6	0	R-22 5120
4	R-7	0	R-23 10240
	R-8	0	R-24 10240
5	R-9	0	R-25 5120
	R-10	0	R-26 10240
6	R-11	0	R-27 5120
	R-12	0	R-28 10240
7	R-13	0	R-29 10240
	R-14	0	R-30 10240
8	R-15	0	R-31 10240
	R-16	0	R-32 10240

5.4 Statistik Deskriptif Titer Antibodi Klinici

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
SEBELUM	16	0	0	.00	.00
SETELAH	16	2560	10240	7840.00	2876.44
Valid N (listwise)	16				

Lampiran 6 Hasil Fertilisasi *in vitro* pada Kambing

6.1 Data Hasil Fertilisasi *in vitro* pada Kambing

Kontrol			Antibodi gZP3			Antigen (gZP3)		
Fertil	Oosit	Persen	Fertil	Oosit	Persen	Fertil	Oosit	Persen
4	9	44.44	0	10	0.00	0	12	0.00
3	11	27.27	0	10	0.00	1	14	7.14
5	13	38.46	1	11	9.09	1	17	5.88
5	13	38.46	1	13	7.69	1	12	8.33
6	17	35.29	2	28	7.14	2	15	13.33
7	21	33.33	2	25	8.00	3	19	15.79
8	19	42.11	0	14	0.00	0	11	0.00
7	17	41.18	1	28	3.57	1	15	6.67
4	11	36.36	0	30	0.00	2	10	20.00
5	11	45.45	1	27	3.70	1	10	10.00
4	11	36.36	2	26	7.69	2	11	18.18
Rata-rata :		38.07	Rata-rata :		4.26	Rata-rata :		9.58
SD :		5.23	SD :		3.78	SD :		6.70

6.2 Analisis Statistik Hasil Fertilisasi *in vitro* pada Kambing

Oneway

Descriptives

PERSEN

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	11	38.0645	5.2347	1.5783	34.5478	41.5813	27.27	45.45
2	11	4.2618	3.7752	1.1383	1.7256	6.7980	.00	9.09
3	11	9.5745	6.6975	2.0194	5.0751	14.0740	.00	20.00
Total	33	17.3003	15.9436	2.7754	11.6469	22.9537	.00	45.45

Test of Homogeneity of Variances

PERSEN

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.379	2	30	.267

ANOVA

PERSEN

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7269.275	2	3634.637	126.041	.000
Within Groups	865.110	30	28.837		
Total	8134.385	32			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PERSEN

LSD

(I) PERLAKUAN	(J) PERLAKUAN	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	33.8027	2.2898	.000	29.1264	38.4791
	3	28.4900	2.2898	.000	23.8136	33.1664
2	1	-33.8027	2.2898	.000	-38.4791	-29.1264
	3	-5.3127	2.2898	.027	-9.9891	-.6364
3	1	-28.4900	2.2898	.000	-33.1664	-23.8136
	2	5.3127	2.2898	.027	.6364	9.9891

* The mean difference is significant at the .05 level.

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
SEBELUM	16	0	0	.00	.00
SETELAH	16	2560	10240	7840.00	2876.44
Valid N (listwise)	16				

Lampiran 7 Titer Antibodi Serum Mencit mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3

7.1 Data Titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing

7.1.1 *Checker board* sama dengan Lampiran 4.1.

7.1.2 Data Konversi Nilai Optical Density–Titer Antibodi Mencit sebelum Imunisasi

Identitas	OD-1	OD-1	Rata-2	Titer
MK-1	0.436	0.414	0.425	40
MK-2	0.441	0.488	0.4645	40
MK-3	0.271	0.304	0.288	40
MK-4	0.312	0.466	0.389	40
MK-5	0.433	0.467	0.45	40
MK-6	0.488	0.634	0.561	80
MK-7	0.424	0.271	0.3475	40
MK-8	0.416	0.312	0.364	40
MK-9	0.341	0.440	0.391	40
MK-10	0.647	0.538	0.5925	80

7.1.3 Konversi nilai *Optical Density* - Titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) setelah imunisasi

Identitas	OD-1	OD-1	Rata-2	Titer
MP-1	1.456	1.498	1.477	640
MP-2	1.569	1.617	1.593	640
MP-3	1.542	1.587	1.565	640
MP-4	1.170	1.333	1.252	320
MP-5	1.605	1.630	1.618	640
MP-6	1.527	1.560	1.544	640
MP-7	1.533	1.550	1.542	640
MP-8	1.587	1.604	1.596	640
MP-9	1.109	1.231	1.170	320
MP-10	1.548	1.608	1.578	640

7.1.4 Data Titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing

Identitas	Pre Imunisasi	Identitas	Post Imunisasi
MK-1	40	MP-1	640
MK-2	40	MP-2	640
MK-3	40	MP-3	640
MK-4	40	MP-4	320
MK-5	40	MP-5	640
MK-6	80	MP-6	640
MK-7	40	MP-7	640
MK-8	40	MP-8	640
MK-9	40	MP-9	320
MK-10	80	MP-10	640

7.2 Uji statistik titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing

T-Test

Group Statistics

TITER	PERLAKUAN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
	1	10	48.00	16.865	5.333
	2	10	576.00	134.924	42.667

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
TITER	Equal variances assumed	12.062	.003	-12.279	18	.000	-528.00	42.999	-618.337	-437.663
	Equal variances not assumed			-12.279	9.281	.000	-528.00	42.999	-624.822	-431.178

Lampiran 8 Hasil Fertilisasi *in vitro* pada mencit (*Mus musculus*).

8.1 Data dan analisis statistik hasil fertilisasi *in vitro* mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune* serum (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

Tetes ke-	Jumlah Oosit	Kontrol		Perlakuan	
		Fertil	Gagal	Fertil	Gagal
1	11	5	0	0	6
2	13	8	0	0	5
3	15	4	0	0	11
4	15	9	0	0	6
5	13	8	0	0	5
6	11	8	0	0	3
7	15	6	0	0	9
8	10	6	0	0	4

8.2 Uji dan analisis statistik hasil fertilisasi *in vitro* mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune* serum (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

T-Test

Group Statistics

KELOMPOK		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
FERTILIS	k	8	6.75	1.75	.62
	p	8	.00	.00	.00
GAGAL	k	8	.00	.00	.00
	p	8	6.13	2.64	.93

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
FERTILIS	Equal variances assumed	36.000	.000	10.894	14	.000	6.75	.62	5.42	8.08
	Equal variances not assumed			10.894	7.000	.000	6.75	.62	5.28	8.22
GAGAL	Equal variances assumed	11.156	.005	-6.556	14	.000	-6.13	.93	-8.13	-4.12
	Equal variances not assumed			-6.556	7.000	.000	-6.13	.93	-8.33	-3.92

Lampiran 9 Hasil *Binding Assay* pada mencit (*Mus musculus*).9.1 Data hasil *Binding Assay* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune serum* (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

No.	Kontrol (K)	Perlakuan (P)	P/K	Binding Index
1	37	2	0.0541	5.41
2	43	2	0.0465	4.65
3	33	0	0.0000	0.00
4	34	4	0.1176	11.76
5	31	3	0.0968	9.68
6	33	2	0.0606	6.06
7	37	1	0.0270	2.70
8	33	0	0.0000	0.00
9	35	2	0.0571	5.71
10	35	3	0.0857	8.57
Rataan	35.10	1.90	0.0545	5.45
SD	3.35	1.29	0.0388	3.88

9.2 Uji statistik hasil *Binding Assay* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune serum* (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

T-Test

Group Statistics

	KELOMPOK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
JUMLAH	1	10	35.10	3.35	1.06
	2	10	1.90	1.29	.41

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper	
JUMLAH	Equal variances assumed	3.379	.083	29.269	18	.000	33.20	1.13	30.82	35.58
	Equal variances not assumed			29.269	11.601	.000	33.20	1.13	30.72	35.68

Lampiran 10 Susunan Asam Amino ZP3 Beberapa Spesies

10.1 Manusia (*Homo sapiens*)

1: NM_007155. Homo sapiens zona...[gi:23097341]

LOCUS ZP3 1299 bp mRNA linear PRI 25-SEP-2002
 DEFINITION Homo sapiens zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor) (ZP3), mRNA.
 ACCESSION NM_007155
 VERSION NM_007155.2 GI:23097341
 KEYWORDS
 SOURCE human.
 ORGANISM *Homo sapiens*
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.

- REFERENCE 1 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Chamberlin,M.E. and Dean,J.
 TITLE Human homolog of the mouse sperm receptor
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (16), 6014-6018 (1990)
 MEDLINE [90349545](#)
 PUBMED [2385582](#)
- REFERENCE 2 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS van Duin,M., Polman,J.E., Verkoelen,C.C., Bunschoten,H., Meyerink,J.H., Olijve,W. and Aitken,R.J.
 TITLE Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations
 JOURNAL Genomics 14 (4), 1064-1070 (1992)
 MEDLINE [93122771](#)
 PUBMED [1478648](#)
- REFERENCE 3 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Rankin,T. and Dean,J.
 TITLE The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat
 JOURNAL Rev Reprod 5 (2), 114-121 (2000)
 MEDLINE [20337608](#)
 PUBMED [10864856](#)
- REFERENCE 4 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Kiefer,S.M. and Saling,P.
 TITLE Proteolytic processing of human zona pellucida proteins
 JOURNAL Biol. Reprod. 66 (2), 407-414 (2002)
 MEDLINE [21663376](#)
 PUBMED [11804956](#)
- REFERENCE 5 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Qi,H., Williams,Z. and Wassarman,P.M.
 TITLE Secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins by growing mouse oocytes microinjected with epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3
 JOURNAL Mol. Biol. Cell 13 (2), 530-541 (2002)
 MEDLINE [21843683](#)
 PUBMED [11854410](#)
- REFERENCE 6 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Zhao,M., Gold,L., Ginsberg,A.M., Liang,L.F. and Dean,J.
 TITLE Conserved furin cleavage site not essential for secretion and integration of ZP3 into the extracellular egg coat of transgenic mice
 JOURNAL Mol. Cell. Biol. 22 (9), 3111-3120 (2002)
 MEDLINE [21938536](#)
 PUBMED [11940668](#)
- REFERENCE 7 (bases 1 to 1299)
 AUTHORS Wassarman,P.M.
 TITLE Sperm receptors and fertilization in mammals
 JOURNAL Mt Sinai J Med 69 (3), 148-155 (2002)
 MEDLINE [22030729](#)
 PUBMED [12035074](#)
- COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to final NCBI review. The reference sequence was derived from [M60504.1](#). On Sep 18, 2002 this sequence version replaced [gi:6005983](#).

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1299
 /organism="Homo sapiens"
 /db_xref="taxon:9606"
 /chromosome="7"
 /map="7q11.23"
 /cell_type="ovary"

gene 1..1299
 /feature="ZP3"
 /note="ZPC; ZP3A; ZP3B; HUMZP3; ZP3-372; ZP3-424"
 /db_xref="LocusID:7784"
 /db_xref="MIM:182889"

CDS 11..1285
 /feature="ZP3"
 /note="zona pellucida sperm-binding protein 3 precursor;
 zona pellucida protein C; zona pellucida glycoprotein 3A;
 zona pellucida glycoprotein 3B; sperm receptor"
 /codon_start=1
 /product="zona pellucida glycoprotein 3"
 /protein_id="NP_009086.2"
 /db_xref="GI:23097342"
 /db_xref="LocusID:7784"
 /db_xref="MIM:182889"
 /translation="MELSYRLFICLLWGSTELCYPQPLWLLQGGASHPETSVPV
 ECQEATLMVMVSKDLFGTGKLRADLTGPEACEPLVSMDETDEVVRFVGLHECGNS
 MQVTDDALVYSTFLLHDP RPVGNLSIVRTNRAEIPICRYPRQGNVSSQAILPTWLPF
 RTTVFSEEKLTFFSLRLMEENWNAEKRSPTFHLGDAHLQAEIHTGSHVPLRLFVDHCV
 ATPTPDQNASPYHTIVDFHGCLVDGLTDASSAFKVP RP GPDTLQFTVDV FHFANDSRN
 MIYITCHLKVTLAEQDPDELNKACFSKPSNSWFPVEGPADICQCCNKGD CGTPSHSR
 RQPHVMSQWSRSASRNRRHVTEADVTVGPLIFLDRRGDHEVEQWALPSDTSVLLGV
 GLAWVSLTLTAVILVLRRCRTASHPVSAE"

sig_peptide 11..76
 /feature="ZP3"
 /note="G00-128-007"

mat_peptide 77..1282
 /feature="ZP3"
 /product="zona pellucida glycoprotein 3"
 /note="G00-128-007"

misc feature 143..919
 /feature="ZP3"
 /note="ZP; Region: Zona pellucida (ZP) domain"
 /db_xref="CDD:smart00241"

misc feature 143..919
 /feature="ZP3"
 /note="zona pellucida; Region: Zona pellucida-like domain"
 /db_xref="CDD:pfam00100"

BASE COUNT 273 a 392 c 351 g 283 t

ORIGIN

1 tgcaggtaacc atggagctga gctataggct cttcatctgc ctcctgctct ggggtagtac
 61 tgagctgtgc tacccaac ccctdggct ctgacagggg ggagccagcc atcctgagac
 121 gtcogtacag ccogtactgg tggagtgtca ggaggocact ctgatgttca tggcagcaa
 181 agaccitftt ggcaccggga agctcatcag ggctgctgac ctacacttgg gccagagggc
 241 ctgtgagcct ctgtctcca tggacacaga agatgtgtc aggttgagg ttgactcca
 301 cgagtgtggc aacagcatgc aggtaactga cgatgccctg gtgtacagca ccttctgct

```

361 ccagacccc cgcgccgtgg gaaacctgtc catcgtgagg actaaccccg cagagattcc
421 catcagatgc cgtaccocca ggcagggcaa tctgagcagc caggccatcc tgcccaactg
481 gtgcccctc aggaccacgg tctctcaga ggagaagctg actttctctc tgcgtctgat
541 ggaggagaac tggaacgctg agaagaggtc ccacacctc cacctgggag atgcagocca
601 cctccaggca gaaatccaca ctggcagcca cgtgccactg cgggtgttg tggaccactg
661 cgtggccaca ccgacaccag accagaatgc cccccctat cacaccatog tggacttcca
721 tggctgtct gtgacggtc tcaactgatc ctctctgca tcaaaagtc ctgacccgg
781 gccagataca ctccagtca cagtggatgt ctccactt gctaatgact ccagaaacat
841 gatatacatc acctgccacc tgaaggtcac cctagctgag caggaccag atgaactcaa
901 caaggcctgt tcttcagca agccttcaa cagctgggtc ccagtggaag gcccggtga
961 catctgcaa tctgtaaca aagggtgactg tggcactcca agccattcca ggaggcagcc
1021 tcatgtcatg agccagtgtt ccaggtctgc ttccgtaac cgcaggcatg tgacagaaga
1081 agcagatgic acctgtgggc cactgatctt cctggacagg aggggtgacc atgaagtga
1141 gcagtgggct ttgcctctg acacctcagt ggtctgctg gccgtaggcc tgcctgtgtt
1201 ggtgtccctg actctgactg ctgtatcct ggttctcacc aggaggtgic gcactgcctc
1261 ccacctgtg tctgctccg aataaaagaa gaaagcaat//

```

Revised: July 5, 2002.

10.2 Mencit (*Mus musculus*)

NCBI Sequence Viewer

EntrezPubMedNucleotideProteinGenomeStructurePMCTaxonomyBooks
 Search PubMed Protein Nucleotide Structure Genome Books
 CancerChromosomes 3D Domains Domains Gene GEO GEO DataSets
 HomoloGene Journals MeSH NCBI Web Site OMIM PMC PopSet SNP
 Taxonomy UniGene UniSTS for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

ASN.1 Summary FASTA TinySeq XML GenBank GBSeq XML GI List
 Graphics XML default Show: 1 2 5 10 20 50 100 200 500 File
 Text Clipboard

1: NM_011776. Mus musculus zona...[gi:6756082] Links

LOCUS NM_011776 1317 bp mRNA linear ROD 20-DEC-2003
 DEFINITION Mus musculus zona pellucida glycoprotein 3 (Zp3), mRNA.
 ACCESSION NM_011776
 VERSION NM_011776.1 GI:6756082
 KEYWORDS .
 SOURCE Mus musculus (house mouse)
 ORGANISM Mus musculus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1317)

REFERENCE 6 (bases 1 to 1317)
 AUTHORS Kinloch,R.A. and Wassarman,P.M.
 TITLE Nucleotide sequence of the gene encoding zona pellucida
 glycoprotein ZP3—the mouse sperm receptor
 JOURNAL Nucleic Acids Res. 17 (7), 2861-2863 (1989)
 PUBMED 2541416

REFERENCE 7 (bases 1 to 1317)
 AUTHORS Kinloch,R.A., Roller,R.J., Fimiani,C.M., Wassarman,D.A. and
 Wassarman,P.M.
 TITLE Primary structure of the mouse sperm receptor polypeptide
 determined by genomic cloning
 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (17), 6409-6413 (1988)
 PUBMED 2842770

REFERENCE 8 (bases 1 to 1317)
 AUTHORS Ringuette,M.J., Chamberlin,M.E., Baur,A.W., Sobieski,D.A. and
 Dean,J.
 TITLE Molecular analysis of cDNA coding for ZP3, a sperm binding protein
 of the mouse zona pellucida
 JOURNAL Dev. Biol. 127 (2), 287-295 (1988)
 PUBMED 3378665

REFERENCE 9 (bases 1 to 1317)
 AUTHORS Salzmann,G.S., Greve,J.M., Roller,R.J. and Wassarman,P.M.
 TITLE Biosynthesis of the sperm receptor during oogenesis in the mouse
 JOURNAL EMBO J. 2 (9), 1451-1456 (1983)
 PUBMED 11892795

REMARK GeneRIF: The extreme heterogeneity of mature ZP3, with respect
 to both mol. wt. and isoelectric point, is partly a consequence of the N-linked
 oligosaccharides and not the polypeptide chain itself.

COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to
 final

NCBI review. The reference sequence was derived from M20026.1.

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..1317
	/organism="Mus musculus"
	/mol_type="mRNA"
	/strain="NIH SWISS"
	/db_xref="taxon:10090"
	/chromosome="5"
	/map="5 77.0 cM"
gene	1..1317
	/gene="Zp3"
	/note="synonym: Zp-3"
	/db_xref="GeneID:22788"
	/db_xref="LocusID:22788"
	/db_xref="MGI:99215"

CDS 30..1304
 /gene="Zp3"
 /note="go_component: integral to membrane [goid 0016021]
 [evidence TAS] [pmid 12466851];
 go_component: extracellular matrix [goid 0005578]
 [evidence IEA];
 go_component: extracellular space [goid 0005615] [evidence
 TAS] [pmid 12466851];
 go_function: receptor activity [goid 0004872] [evidence
 IEA];
 go_function: protein binding [goid 0005515] [evidence IPI]
 [pmid 11739644];
 go_process: binding of sperm to zona pellucida [goid
 0007339] [evidence IDA] [pmid 11739644]"
 /codon_start=1
 /product="zona pellucida glycoprotein 3"
 /protein_id="NP_035906.1"
 /db_xref="GI:6756083"
 /db_xref="GeneID:22788"
 /db_xref="LocusID:22788"
 /db_xref="MGI:99215"
 /translation="MASSYFLFLCLLLCGGPELONSQTLWLLPGGTPTVVGSSSPVKV
 ECLEAELVVTVSRDLFGTGKLVQPGDLTLGSEGCQPRVSVDTDVVRFNAQLHECSSRV
 QMTKDALVYSTFLLHDP RPVSGLSILRTNRVEVPIECRYPRQGNVSSHPIQPTWV PFR
 ATVSSEEKLAFLSLRLMEENWNTEKSAPTFHLGGEVAHLQAEVQTGSHLPLQLFVDHCVA
 TPSPLPDPNSSPYHFIVDFHGCLVDGLSEFSFAFQVPRPRPETLQFTVDVVFHFANSSR
 NTLYITCHLKVAPANQIPDKLNKACSFNKTSQS WLPVEGDADICCCSHGNCSNSSSS
 QFQIHGPRQWSKLVSRNR RHVTDEADVTVGPLIFLFGKANDQTVEGWTASAQTSVALGL
 GLATVAFLTAAIVLAVTRKCHSSSYLVSLPQ"

sig_peptide 30..95
 /gene="Zp3"
 /note="ZP3 signal peptide; putative"

mat_peptide 96..1301
 /gene="Zp3"
 /product="zona pellucida glycoprotein 3"
 /note="sperm-binding protein; ZP3"

misc_feature 162..941
 /gene="Zp3"
 /note="zona_pellucida; Region: Zona pellucida-like domain"
 /db_xref="CDD:15117"

variation 1237
 /gene="Zp3"
 /allele="T"
 /allele="C"
 /db_xref="dbSNP:3091076"

ORIGIN

```

1  ctgagcccag ctgtactcca ggogggacca tggcgtcaag ctatttcctc ttcccttgtc
61  tctgctgtg tggaggcccc gagctgtgca attcccagac tctgtggcct ttgccgggtg
121  gaactccac cccagtgggg toctcatcac ctgtgaaggt ggagtgtctg gaagctgaac
181  tagtggtagc tgtcagtaga gaccttttg gcacggggaa gctgggtcag cccggggacc
241  tcaccctgg ctcagagggg tgcagcccc ggggtccgt ggataccgac gtggtcaggt
301  tcaacgcca gttgcacgag tgcagcagca gggtcagat gacgaaagat gccctgggtg
361  acagcacctt cctactccac gacctcgcc ctgtgagtg cctgtccatc ctcaggacta
421  accgtgtgga ggtaccatt gagtgccgat accccaggca gggcaatgtg agcagccacc
481  ctatccagcc cacctgggt ccttcagag ccactgtgtc ctcagaggag aaactggctt
541  tctctctcg cctgatggag gagaactgga atactgagaa atcggctccc acctccacc
601  tgggagaggt agcccacctc caggcagaag tccagactgg aagccacctg ccgctgcagc
661  tgtttgtgga ccactgcgtg gccacgcctt caccttgcc agaccogaac tctccccct
721  atcactcat cgtggactc cacggtgccc ttgtggatgg tctatctgag agctttcgg
781  cattcaagt ccccagaccc cggocagaga cctccagtt cacggtggat gtattccatt
841  ttccaacag ctccagaaat acgctctaca tcaoctgcca tctcaaagtc gogccagcta
901  accagatccc cgataagtc aacaaagcct gttcgtcaa caagacttc cagagttggt
961  tgccagtaga gggtagtct gacatctgtg atgctgcag ccatggcaac ttagtaatt
1021  caagctctc acagtccag atccatggac cccgccagtg gtccaagcta gttctcgaa
1081  accgcaggca cgtgaccgat gaagctgatg tcactgtagg gccctgata ttcttgaa
1141  aggccaacga ccagactgtg gaaggctgga ctgctctgc tcaaacctt gtggctctg
1201  ggttaggcct ggccacagtg gcattctga cctggcagc tatagtcctt gctgtacca
1261  ggaagtgta ctctctcc tacctgtat ccttcgca ataaaagaag aaactca//

```

Disclaimer | Write to the Help Desk
 NCBI | NLM | NIH

May 6 2004 12:36:28

10.3 Sapi (*Bos taurus*)

NCBI Sequence Viewer

EntrezPubMedNucleotideProteinGenomeStructurePMCTaxonomyBooks

Search PubMed Protein Nucleotide Structure Genome Books

CancerChromosomes 3D Domains Domains Gene GEO GEO DataSets
 HomoloGene Journals MeSH NCBI Web Site OMIM PMC PopSet SNP
 Taxonomy UniGene UniSTS for

Limits Preview/Index History Clipboard Details

ASN.1 Summary FASTA TinySeq XML GenBank GBSeq XML GI List
 Graphics XML default Show: 1 2 5 10 20 50 100 200 500 File
 Text Clipboard

1: NM_173974. Bos taurus zona p...[gi:31343138] Links

LOCUS NM_173974 1426 bp mRNA linear MAM 22-DEC-2003
 DEFINITION Bos taurus zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor) (ZP3),
 mRNA.
 ACCESSION NM_173974
 VERSION NM_173974.2 GI:31343138
 KEYWORDS .

SOURCE Bos taurus (cow)
 ORGANISM Bos taurus
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Mammalia; Eutheria; Cetartiodactyla; Ruminantia; Pecora; Bovidae;
 Bovinae; Bos.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1426)
 AUTHORS Harris,J.D., Hibler,D.W., Fontenot,G.K., Hsu,K.T., Yurewicz,E.C.
 and Sacco,A.G.
 TITLE Cloning and characterization of zona pellucida genes and cDNAs from
 a variety of mammalian species: the ZPA, ZPB and ZPC gene families
 JOURNAL DNA Seq. 4 (6), 361-393 (1994)
 PUBMED 7841460
 COMMENT PROVISIONAL REFSEQ: This record has not yet been subject to
 final

NCBI review. The reference sequence was derived from U05775.1.
 On Jun 3, 2003 this sequence version replaced gi:27806770.

FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1426
 /organism="Bos taurus"
 /mol_type="mRNA"
 /db_xref="taxon:9913"
 gene 1..1426
 /gene="ZP3"
 /db_xref="GenelD:280964"
 /db_xref="LocusID:280964"
 CDS 149..1414
 /gene="ZP3"
 /codon_start=1
 /product="zona pellucida glycoprotein 3 (sperm receptor)"
 /protein_id="NP_776399.1"
 /db_xref="GI:27806771"
 /db_xref="GenelD:280964"
 /db_xref="LocusID:280964"

```

/translation="MGPCSRFLVCFLLWGSTELCSPQPFWDETERFRPSKPPAVMVE
CQEAQLWTVDKDLFGTGKLRPADLTLGPDNCEPLASADTDGVVRFVAVGLHECGNIL
QVTDNALVYSTFLLHNPRPAGNLSILRTNRAEVPIECHYPRQGNVSSWAIQPTWVWVFR
TTVFSEEKLVFSLRLMEENWSAEKMTPTFQLGDRAHLQAQVHTGSHVPLRLFVDHCVA
SLTPDWSTSPYHTIVDFHGCLVDGLTDASSAFKAPRPRPEILQFTVDVFRFANDSRNM
IYITCHLKVTPVDRVPDQLNKACFSKSSNRWSPVEGPTDICRCCSKGRCGISGRSMR
LSHREGRVPRSRRHVTEADVTVGPLIFLRKMNDRGVEGPTSSPPLVMLGLGLATVM
TLTLAAIVLGLTGRLRAASHPVCPVSASQ"

```

```
misc_feature 278..1054
```

```
  /gene="ZP3"
```

```
  /note="zona_pellucida; Region: Zona pellucida-like domain"
```

```
  /db_xref="CDD:15117"
```

```
polyA_signal 1410..1415
```

```
  /gene="ZP3"
```

```
polyA_site 1426
```

```
  /gene="ZP3"
```

```
  /note="17 A nucleotides"
```

ORIGIN

```

1  ccggggcctc cctactctca ggaaggcagg cgctcacctc ctcaagttct cgatctcggc
61  cgggatgctc tgaagctggt tgccgcgag gctgagggtc tgcagcggcg cagtcacgca
121  gcgaggtggg agtggcttcg tgggcacat ggggcccgtc tctaggctgt tctctgctt
181  tctgctctgg ggaagcacag agctctgcag ccccagccc ttctgggatg atgaaaccga
241  ggccttcagg ccatcaaagc cgcgcgccgt gatggtggag tgcaggagg cccagctggt
301  ggtcacagtc gacaaagacc tttcggcac agggaagctc atccggcctg cggacctcac
361  cctgggccc gacaactgtg agccgctggc ctccgaggac accgatggcg tggtaggtt
421  tgogtccggg ctgcaagagt gtggcaacat ctgcaggtg accgacaatg cctggtgta
481  cagcaccttc ctgctccaca acccccgcc tgcaggaaac ctgtccatcc tgaggactaa
541  ccgocagag gtcccatcg agtgccacta cccaggcag ggcaatgta gtagctgggc
601  catccagccc acctgggtgc cattcaggac cacagtgttc tggaggaga agctggtttt
661  ctctctgcgc ctgatggagg agaactggag gcgcgagaag atgacgccc cctccagct
721  gggagacaga gccacctcc aggcccaagt gcacactggc agccacgtgc cctgcggct
781  gttcgtggac cactgcgtgg ccagcctgac gccagactgg agcaactccc cttaccacac
841  catcgtggac ttocatggtt gtctctoga tggctcacc gatgcctcct ctgcttcaa
901  agcaccocaga ccagaccgg agatctcca gttcacagtg gatgtgtcc gttttgctaa
961  tgactocaga aacatgatat ataccactg ccacctgaag gtcactccgg ttgaccgagt
1021  cccggaccaa ctaaacaag cctgtcctt cagcaagtcc tcaacagggt ggtccccgtt
1081  tgaaggcccc actgacatct gtcgatgctg tagcaagggg cgctgtggca ttcaggccc
1141  ttccatgagg ctgtcccacc gggagggcag gctgttccc cgaagtgcga ggcacgtgac
1201  ggaggaagca gatgtcaccg tggggccgtt gatcttctg aggaagatga atgaccgtgg
1261  cgtggaaggg cccacctct cccccctct ggtgatgctg ggcttaggcc tggctactgt
1321  gatgacctg actctggctg ccattgtct ggtctcact gggaggctc gggctgctc
1381  tcaccccggt tgccctgtgt ctgcttcca ataaaagaag aaagtg//

```

Disclaimer | Write to the Help Desk

NCBI | NLM | NIH

May 6 2004 12:36:28