

Perbandingan Sekuen Nukleotid gZP3 terhadap Sekuen Konsensus Nukleotid ZP3 Wanita dan Beberapa Spesies untuk Pengembangan Bahan Imunokontrasepsi

by Eduardus Bimo Aksono

Submission date: 30-Jun-2021 11:20AM (UTC+0800)

Submission ID: 1613996418

File name: Perbandingan_Sekuens_Nukleotid_gZP3.pdf (3.24M)

Word count: 3151

Character count: 19353

Perbandingan Sekuen Nukleotid gZP3 terhadap Sekuen Konsensus Nukleotid ZP3 Wanita dan Beberapa Spesies untuk Pengembangan Bahan Imunokontrasepsi
4
Comparison of gZP3 Nucleotide Sequence to ZP3 Nucleotide Consensus Sequence of Women and Several Species for Development of Immunocōntraception Substance

Imam Mustofa¹, Eduardus Bimo Aksono¹ dan Heru Pradoto²

¹Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115
Tlp. 0315992377, fax. 0315993015
E-mail: mustof@unair.ac.id

²Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Abstract

In our previous research, gZP3 had been successfully identified as the receptor for spermatozoa on goat zona pellucida. Immunization of animal model with gZP3 indicated that gZP3 effectively raised antibody, prevented pregnant reversibly, did not influence hormone profile, estrous cycle and ovarian cyclicity. Based on ration above, this research was designed to compare nucleotide sequence of gZP3 toward hZP3 and ZP3 several species in order to find the epitope of gZP3 which was homologue with the amino acid sequence of human ZP3 as the candidate of immunocōntraception substance in the future. Goat fresh ovaries from Pegirian Slaughter house Surabaya Were aspirated for the follicular fluid as samples. Samp¹⁵ were extracted by total DNA, amplified in PCR machine by 35 cycles. Result of DNA amplification was purified and sequenced using Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and ABI Prism 310 (Perkin-Elmer). Nucleotida sequence data obtained were analysed for homology and phylogenic construction using GENETIX MAC version 80 software (compared to consensus data of ZP3 region of some species obtained from Genbank). Result of the research indicated that foat ZP3 peptide had a higher homology percentage to human ZP3 peptide (51.2%) compared to those of Bos taurus (49.7%), *Macaca mullata* (47.4%), *Macaca radiata* (47.62%) and *Macaca fascicularis* (47.35%). It could be concluded that gZP3 peptide which homologue with hZP3 has been known, could be produced using over expression technique and clinically tested on primates.

Key words: Goat zona pellucida-3, PCR, nucleotide sequence

Abstrak

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi protein gZP3 sebagai reseptor spermatozoa pada zona pelusida kambing. Uji imunisasi pada hewan coba menunjukkan bahwa gZP3 efektif menghasilkan antibodi gZP3, mencegah kebuntingan secara reversibel, s²¹ tidak memengaruhi profil hormon, siklus birahi dan siklus perkembangan ovarium. Berdasarkan hal-hal tersebut di atas maka dilakukan penelitian untuk memperbandingkan sekuen nukleotida gZP3 terhadap sekuen nukleotida ZP3 manusia (hZP3) dan ZP3 beberapa spesies, dengan maksud untuk menemukan epitop gZP3 yang homolog dengan hZP3 sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi di masa mendatang. Ovarium segar kambing dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya, diaspirasi cairan folikel berikut kompleks oosit-kumulusnya sebagai sampel. Sampel tersebut diekstrak untuk mendapatkan total DNA dan dia¹plifikasi dengan PCR 35 siklus. Hasil amplifikasi DNA dimurnikan dan disekuen menggunakan Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit dan ABI Prism 310 (Perkin-Elmer). Data sekuen nukleotid yang diperoleh dianalisis homologi dan konstruksi filogenetiknya menggunakan GENETIX MAC version 80 software (dibandingkan dengan data sekuen nukleotid konsensus regio ZP3 beberapa spesies yang didapat dari Genbank). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gZP3 mempunyai homologi yang lebih tinggi terhadap hZP3 (51,2%), dibandingkan dengan ZP3 sapi, *Bos taurus* (49,7%), dan kera, *Macaca fascicularis* (47,35%). Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa nukleotid penyandi

peptida gZP3 yang homolog dengan peptida hZP3 dapat diketahui dan dapat diproduksi dengan teknik overekspresi serta diuji secara klinis pada primata.

Kata kunci: Zona pelusida-3 kambing (gZP3), PCR, sekuen nukleotid

Pendahuluan

Metode kontrasepsi yang dipakai penduduk dunia saat ini sebagian terbesar adalah metode kontrasepsi yang menggunakan sediaan hormonal, yaitu suntikan, pil, dan implan. Metode tersebut ternyata menimbulkan berbagai macam efek samping dan komplikasi (Hartanto, 2002). Hal ini dapat menimbulkan keengganan pasangan usia subur untuk berkontrasepsi. Penelitian imunokontrasepsi dilakukan untuk menutupi kekurangan metode kontrasepsi konvensional tersebut. Penelitian tentang imunokontrasepsi dilakukan guna menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi. Penelitian tersebut berfokus untuk menemukan bahan antifertilitas yang langsung bekerja pada gamet, tanpa mengganggu poros endokrin reproduksi. Bahan yang potensial untuk itu adalah protein zona pelusida-3 (ZP3), karena ZP3 merupakan reseptor pengenalan oosit oleh spermatozoa (Barber and Fayrer-Hosken, 2000). Pada wanita, satu oosit diovolasikan dalam satu siklus menstruasi, sehingga apabila satu oosit tersebut telah diblok reseptornya secara imunologis, maka fertilisasi tidak terjadi dan kehamilan dapat ditunda.

Zona pelusida berbagai spesies telah diteliti, namun sampai saat ini belum ada hasil akhir penelitian yang siap diimplementasikan karena berbagai faktor dan efek sampingnya. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi ZP3 pada spesies-spesies lain untuk mendapatkan bahan imunokontrasepsi yang ideal. Studi tentang ZP3 kambing (*goat zona pellucida-3*, gZP3) sampai saat ini belum pernah dilaporkan oleh pihak lain. Serangkaian penelitian eksploratif laboratorik dan eksperimental telah dilakukan dalam lima tahun terakhir. Hasil penelitian yang dicapai selama ini menunjukkan bahwa protein gZP3 mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi yang efektif dan aman.

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil diidentifikasi dan dikarakterisasi gZP3 sebagai reseptor bagi spermatozoa yang ada pada zona pelusida kambing (Mustofa dkk., 2004a; Mustofa dkk., 2005; Mustofa dkk., 2006a). Analisis Elisa dan Dot Blot menunjukkan adanya pengenalan epitop pada antigen gZP3 terhadap serum wanita fertil (Mustofa dkk., 2007). Berdasarkan hal tersebut maka diasumsikan terdapat epitop gZP3 yang homolog dengan *human ZP3* yang kelak diharapkan dapat dipakai sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi. Sehubungan

dengan hal itu terlebih dahulu dilakukan penelitian yang membandingkan sekuen nukleotida gZP3 dengan sekuen nukleotida hZP3 dan spesies lain yang memiliki kekerabatan terdekat.

Metode Penelitian

Koleksi oosit kambing untuk mendapatkan DNA penyandi sintesis gZP3 dilakukan dengan metode yang telah dipakai pada penelitian sebelumnya. Ovarium segar kambing dari Rumah Potong Hewan Pegirian Surabaya, diaspirasi untuk mendapatkan kumulusi oosit kompleks berikut cairan folikelnya sebagai sampel. Sampel dalam tabung Eppendorf 1,5 ml dicuci tiga kali dengan *phosphate buffer saline* (PBS) tanpa Ca dan Mg dengan sentrifugasi 700 rpm 10 menit. *Pellet* yang tersisa ditambah dengan 50 µl *Lysing buffer* kemudian dibiarkan pada 70° C selama 10 menit. Pemeriksaan dengan mikroskop pada pembesaran 200 kali untuk memastikan sampel telah lisis dengan sempurna. Sebanyak 100 µl suspensi di atas dimasukkan tabung Eppendorf 1,5 ml, kemudian diekstraksi dengan 200 µl DNA-zol. Supernatan di buang dengan hati-hati, *pellet* dikeringkan dengan mesin pompa vakum 10 menit. *Pellet* ditambah dengan DW, disimpan pada -20° C atau langsung diproses lebih lanjut. Sebanyak 5 µl sampel DNA gZP3 dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf 0,5 ml, ditambah master Mix Fermentas (yang sudah mengandung enzim, buffer dan dNTP); 2 µl primer sense ZP3; 2 µl primer antisense ZP3, 10 µl emplate DNA gZP3 dan 11 µl DW. Campuran dipanaskan (*pre-heat*) 94° C selama 4 menit kemudian *dispin down* satu detik. Sampel dimasukkan ke dalam mesin PCR 35 *cycles*, terdiri dari denaturasi 94° C 1 menit, *annealing* 55° C 1 menit dan *extension* pada 72° C 2 menit. Pada *cycles* terakhir suhu dipertahankan 72° C 5 menit. Hasil PCR diperoleh 351 pasangan basa (bp), divisualisasi dengan gel agarose 2% yang mengandung ethidium bromide dan didokumentasi dengan film polaroid.

DNA gZP3 hasil amplifikasi PCR kemudian dimurnikan dengan metode fenol-kloroform untuk kepentingan sekuensing menggunakan *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* dan *ABI Prism 310 (Perkin-Elmer)*. Ekstrak kering DNA ditambah dengan 25 µl *Template Suppression Reagent* (TSR), divortex dan dipanaskan pada 95° C selama 2-5 menit. Selanjutnya sampel diinkubasi pada es, kemudian divortex lagi dilanjutkan *spin down* dalam *microfuge*. Pindahkan

sampel pada tabung Eppendorf 0,5 ml kemudian di-running pada *Sequencer machine* ABI Prism 310 untuk mendapatkan *nucleotide sequence* epitop spesifik gZP3.

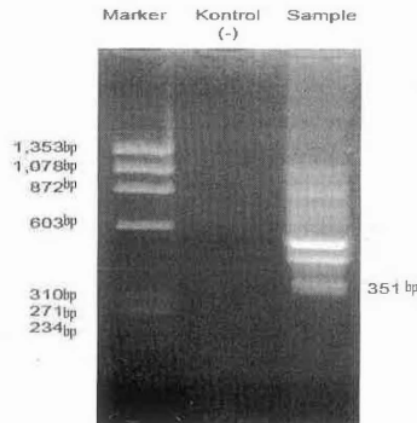
Data sekuen peptida gZP3 yang diperoleh selanjutnya digunakan sebagai bahan analisis homologi dan kekerabatan terhadap data konsensus protein ZP3 sapi (*Bos taurus*), dan beberapa spesies primata (*Macaca mulatta*, *Macaca fascicularis*, dan *Macaca radiata*), serta sekuen protein ZP3 manusia (*Homo sapiens*), yang diperoleh dari Genbank. Analisis homologi dan kekerabatan dilakukan pada urutan nukleotida melalui konstruksi filogenetik pada regio ZP3 dengan menggunakan program komputer *software* GENETIX MAC version 8.0.

Hasil dan Pembahasan

Sampai saat ini sekuen asam amino gZP3 maupun sekuen nukleotida penyandi protein gZP3 belum ditemukan publikasinya, sehingga juga belum dapat diketahui primer yang sesuai untuk penelusuran sekuen protein gZP3. Menurut Zhu dan Naz (1999), spesies dengan kekerabatan terdekat mempunyai homologi urutan nukleotida dan asam amino pada regio ZP3 yang paling besar. Oleh karena itu, primer untuk penelitian ini dieksplorasi secara deduktif dari sekuen ZP3 sapi (bZP3) sebagai spesies yang memiliki kekerabatan dekat dengan kambing, dan sekuen ZP3 primata (*Macaca radiata*) yang memiliki kekerabatan dekat dengan sekuen ZP3 wanita (hZP3). Data sekuen diperoleh dari Genbank (dari NCBI *Sequence Viewer*). Berdasarkan deduksi tersebut didapat data homologi urutan nukleotida 977-996 pada *bovine zona pellucida 3* (bZP3) (Smith *et al.*, 2001), urutan 1036-1055 pada *human zona pellucida 3* (hZP3) (Rankin dan Dean, 2000), serta urutan 842-861 pada *Macaca radiata* (MR) ZP3 (Kolluri *et al.*, 1995). Adapun primer yang dimaksud adalah: primer sense (5-GATATACATCACC TGCCACC-3) dan Primer antisense (5-CCTCCTGGTGAGAACCAGGA-3). Berdasarkan primer tersebut diharapkan diperoleh sekuen nukleotida dari regio gZP3 dengan panjang nukleotida sejumlah 351 *base pairs* (bp) yang homolog dengan sekuen nukleotida hZP3.

Deteksi regio ZP3 digunakan metode *nested PCR* dengan mesin *PCR Thermal Cycler* dari PERKIN-ELMER, terdapat dari *pre-heat* 94° C selama 4 menit, *denaturation* 94° C selama 1 menit, *annealing* 55° C selama 1 menit dan *extension* 72° C selama 2 menit selama 35 siklus dilanjutkan tambahan 72° C selama 5 menit. Hasil PCR diperoleh 351 bp, divisualisasi dengan gel agarose 2% yang mengandung ethidium bromide dan didokumentasi dengan film polaroid. Hasil PCR menunjukkan adanya beberapa band, namun yang dikehendaki adalah band dengan panjang

nukleotida sebesar 351 kb sebagaimana desain primer yang digunakan (Gambar 1). Produk PCR tersebut selanjutnya dipakai sebagai bahan sequencing nukleotida penyandi protein gZP3.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR dengan elektroforesis gel agarosa 2%. Band 351bp adalah produk PCR yang dikehendaki.

Sebagaimana diketahui, terdapat sejumlah homologi urutan asam amino protein ZP3 antara beberapa spesies mamalia yang telah dilaporkan (Zhu and Naz, 1999). Sebagai contoh golongan rodensia yaitu tikus dan hamster (83,9%), golongan karnivora yaitu anjing dan kucing (83,5%), golongan primata yaitu manusia dan kera (95,5%), serta golongan ungulata yaitu babi dan sapi (84,3%), sedangkan pada kambing belum ada yang melaporkan. Pada penelitian ini hasil sekuen yang diperoleh selanjutnya dibandingkan dengan data sekuen nukleotida ZP3 beberapa spesies yang berasal dari Gen Bank. Data urutan nukleotida gZP3, di samping dilakukan homologi sekuen atau urutan nukleotida dengan *human ZP3* atau hZP3 (NM007155) (Rankin dan Dean, 2000), juga dengan beberapa spesies pada hewan yang sudah diketahui regio ZP3 (dari NCBI *Sequence Viewer*), yaitu *Bos taurus* (NM173974) (Smith *et al.*, 2001), *Macaca radiata* (X82639) (Kolluri *et al.*, 1995), *Macaca fascicular* (AS168898) (Osada *et al.*, 2005), dan *Macaca mullata* (XM-001114760) (Harris *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1999). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gZP3 memiliki persentase homologi lebih tinggi dengan *human* dibandingkan dengan *Bos taurus* maupun *Macaca Sp* (Tabel 1) dengan filogenetik (Gambar 2) dan data multisekuen (Gambar 3) Berdasarkan penelitian ini telah diketahui urutan nukleotida gZP3 memiliki persentase homologi lebih tinggi dengan *human* (51,4%) dibandingkan dengan

Bos taurus (49,74%) maupun *Macaca mulatta* (47,4%), *Macaca radiata* (47,6%) dan *Macaca fascicularis* (47,4%). Hasil analisis filogenetik menunjukkan bahwa gZP3 (SAMPEL-PROTEIN-1) merupakan protein yang asing terhadap hZP3 (*human protein*) sebagai target akhir penelitian, maupun primata (*Macaca sp*) untuk tahap uji coba kelak.

Tabel 1. Persentase homologi urutan nukleotida dari regio ZP3 pada kambing, *Bos taurus*, *M. mullata*, *M. radiata*, *M. Fascicular*, dan *Human*

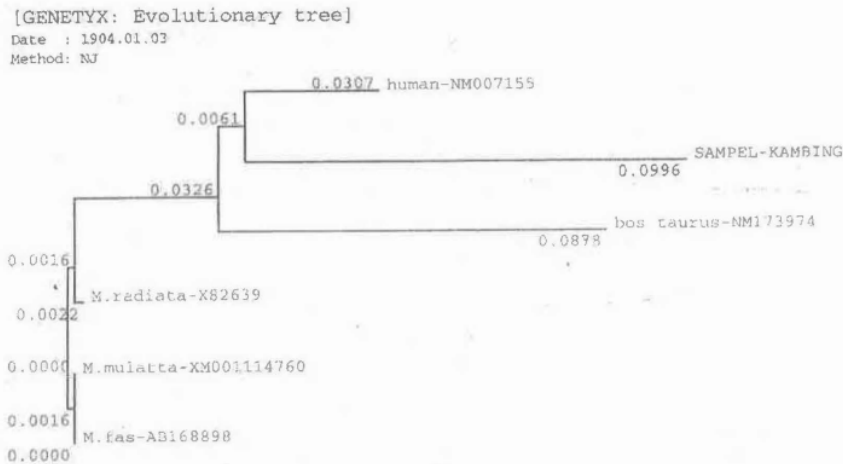
	Spesies Kambing Nukleotida (N)
<i>Bos taurus</i> (NM173974)	49,7%
<i>M. mullata</i> (XM001114760)	47,4%
<i>M. fascicular</i> (AS168898)	47,4%
<i>M. radiata</i> (X82639)	47,6%
Human (NM007155)	51,4%

Penelitian sebelumnya pada mencit (*Mus musculus*) sebagai model menunjukkan bahwa gZP3 efektif menimbulkan antibodi (Restiadi dkk., 2005), mencegah kebuntingan dan tidak memengaruhi jumlah fetus dan patologi fetus pada hewan coba yang bunting (Mustofa dkk., 2004b), reversibel setelah 14 siklus birahi (Mustofa, 2006b), tanpa menimbulkan kelainan siklus birahi (Mulyati dkk., 2003), perubahan profil progesteron serum (Mulyati dkk., 2006; Mustofa

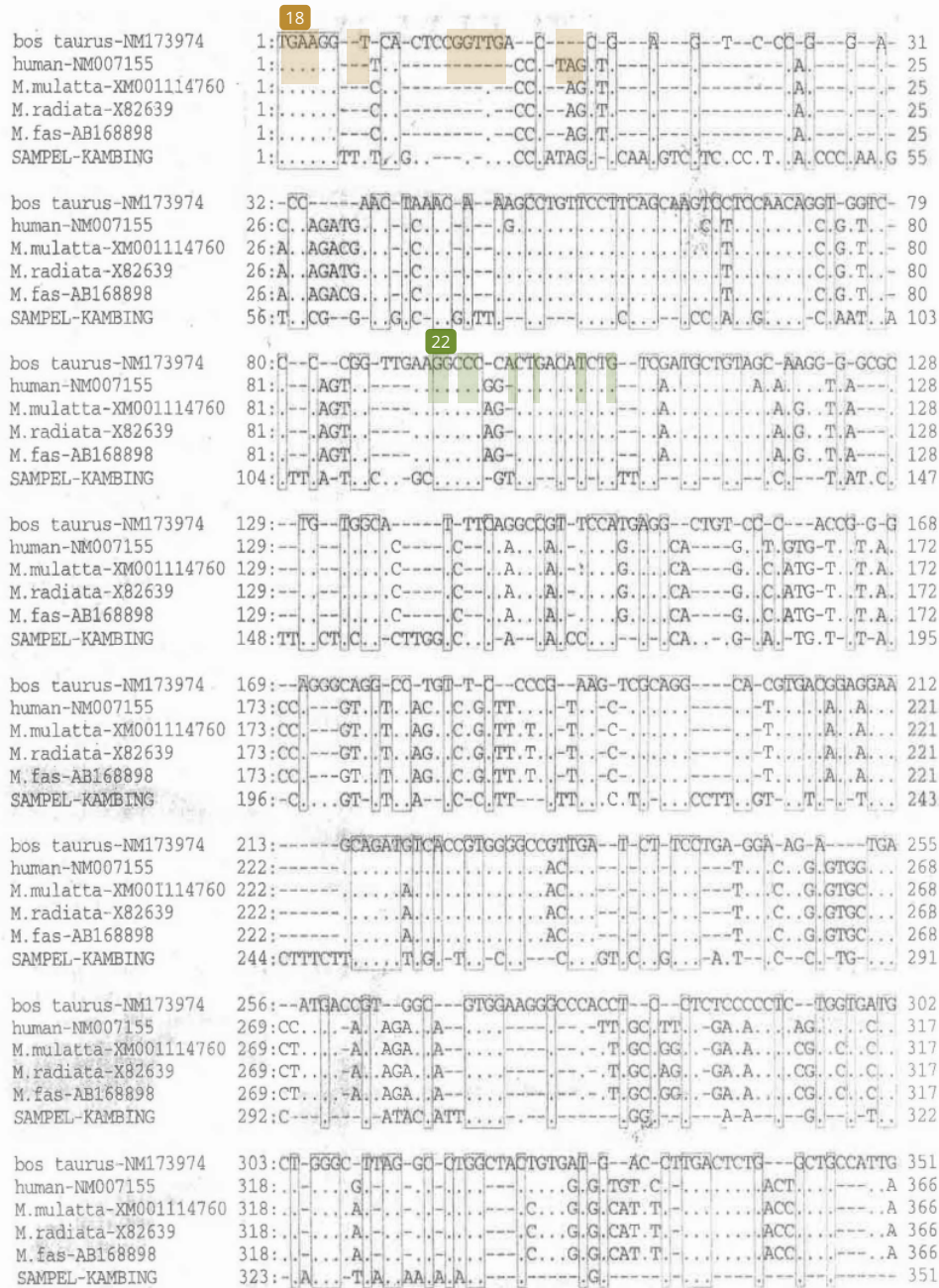
dkk., 2006c) dan tidak menimbulkan gangguan siklus pada ovarium (Mustofa, 2005a). Secara *in vitro* telah dibuktikan pula bahwa tidak terjadinya kebuntingan pada hewan coba model tersebut disebabkan oleh peranan antibodi gZP3 mencegah ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida dalam *Binding assay* (Mustofa, 2006a), sehingga mencegah fertilisasi (Mustofa dkk., 2006b).

Antigen gZP3 dapat dikenali oleh serum wanita fertil dalam uji *Elisa dan Dot blot* (Mustofa dkk., 2007), sehingga diasumsikan terdapat homologi sekuen nukleotida gZP3 dengan hZP3. Pada penelitian ini telah diketahui perbandingan sekuen nukleotida gZP3 yang homolog dengan hZP3, sehingga diharapkan antibodi yang dihasilkannya efektif menutup epitop reseptor fertilisasi pada zona pelusida wanita, dengan demikian bersifat antifertilisasi pada wanita.

Berdasarkan hasil tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui sekuen peptida gZP3 dan penelitian untuk dapat memproduksi peptida asal gZP3 yang homolog dengan protein hZP3 dengan cara *over expression*. Peptida dimaksud selanjutnya perlu diuji potensi imunokontraseptifnya pada primata dengan pengamatan pada efek utama pada infertilitas dan kemungkinan adanya efek samping pada siklus menstruasi dan profil hormon progesteronnya. Uji potensi peptida tersebut secara *in vitro* dapat dilakukan dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay*.



Gambar 2. Filogenetik nukleotida penyandi protein ZP3 (gZP3) dibandingkan beberapa spesies lain



Gambar 3. Multisekuen nukleotida penyandi protein gZP3 dibandingkan beberapa spesies lain

Kesimpulan

Terdapat sekuen nukleotida gZP3 yang homolog dengan hZP3 dengan panjang 351 bp, dan secara filogenetik sekuen nukleotidanya protein gZP3 merupakan protein asing terhadap protein hZP3 dan primata.

Daftar Pustaka

- Barber MR and Fayer-Hosken RA. 2000. Possible mechanisms of mammalian immunoneuroendocrinology. *J. Reprod. Immunol.* 46: 103-124
- Harris JD, Hibler DW, Fontenot GK, Hsu KT, Yurewicz EC and Sacco AG. 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: 361-393.
- Harris JD, Seid CA, Fontenot GK and Liu HF. 1999. Expression and purification of recombinant human zona pellucida proteins. *Protein Expr Purif* 16: 298-307.
- Hartanto H. 2002. KB, Keluarga Berencana dan Kontrasepsi. Jakarta: Pustaka Sinar Harapan, Hal. 14-15, 36-41
- Kolluri SK, Kaul R, Banerjee K and Gupta SK. 1995. Nucleotide sequence of cDNA encoding bonnet monkey (*Macaca radiata*) zona pellucida glycoprotein-ZP3. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 1209-1212.
- Mulyati S, Mustofa I dan Utama S. 2003. Pengaruh Zona pelusida Fraksi 3 (ZP3) Kambing sebagai Bahan Antifertilitas terhadap Siklus Birahi Mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan.* 19: 17-20.
- Mulyati S, Mustofa I dan Mahaputra L. 2006. Siklus Birahi dan Kadar Progesteron dalam Serum Mencit (*Mus musculus*) Sebelum dan Sesudah Imunisasi dengan Bahan Antifertilitas Zona Pelusida-3 Kambing. *Media Kedokteran Hewan.* 22: 51-56.
- Mustofa I, Mahaputra L, Rantam FA dan Restiadi TI. 2004a. Isolasi Zona Pelusida - 3 Kambing dan Identifikasi Reseptor fertilisasi dengan Uji Imunofluoresen. *Media Kedokteran Hewan.* 20: 116-120.
- Mustofa I, Mulyati S dan Mahaputra L. 2004b. Pengaruh Imunisasi dengan Zona Pelusida-3 Kambing terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Anak pada Mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan.* 20: 22-25.
- Mustofa I. 2005. Identifikasi Efek Samping Imunokonstrasepsi Zona Pelusida-3 Kambing pada Histologis Ovarium Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model. *Media Kedokteran Hewan.* 21: 19-22.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Rantam FA dan Hinting A. 2005. Peranan Protein Goat Zona Pellucida-3 (gZP3) sebagai Reseptor Fertilisasi dan Potensinya sebagai Kandidat Bahan Imunokonstrasepsi. *Majalah Ilmu Faal Indonesia.* 5: 34-41.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Rantam FA dan Hinting A. 2006a. Analisis Densitometrik Protein Reseptor Fertilisasi (ZP3) pada Zona Pelusida Kambing sebagai Kandidat Bahan Imunokonstrasepsi. *Media Kedokteran Hewan.* 22(2): 124-130.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Rantam FA, Suwarno, Widjati dan Hinting A. 2006b. Antibodi Protein Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) Asal Mencit (*Mus Musculus*) Mencegah Fertilisasi in vitro Oosit Mencit sebagai Hewan Model. *J. Sain Veteriner.* 24(1): 42-48
- Mustofa I, Mahaputra L, Rantam FA dan Dachlan YA. 2006c. Kandidat Bahan Imunokonstrasepsi Protein gZP3 Tidak Mempengaruhi Fungsi Fisiologis Siklus Birahi Hewan Coba Model. *Majalah Ilmu Faal Indonesia.* 5(3): 115-122.
- Mustofa I. 2006a. Konfirmasi Potensi Imunokonstraseptif Antibodi Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) dengan Teknik Binding Assay pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model. *J. Medis Veteriner Indonesia.* 16: 42-48.
- Mustofa I. 2006b. Uji Reversibilitas Imunokonstrasepsi Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) pada Mencit (*Mus musculus*) sebagai Hewan Model. *Hayati* 13: 173-176.
- Mustofa I, Suwarno dan Utama S. 2007. Protein gZP3 sebagai Kandidat Bahan Imunokonstrasepsi Dikenali oleh Serum Wanita Fertil dengan Analisis Elisa dan Dot Blot. *Majalah Ilmu Faal Indonesia* 6: 79-87.
- Osada N, Hirata M, Tanuma R, Kusuda J, Hida M, Suzuki Y, Sugano S, Gojobori T, Shen CKJ, Wu CI and Hashimoto K. 2005. Substitution rate and structural divergence of 5'UTR evolution: comparative analysis between human and cynomolgus monkey cDNAs. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1976-1982.
- Rankin T and Dean J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod.* 5: 114-121
- Restiadi TI, Mustofa I dan Suwarno. 2005. Peneraan Antibodi Serum Mencit (*Mus musculus*) Sebelum dan Setelah Imunisasi dengan Sediaan Antifertilitas Zona Pelusida-3 Kambing. *Media Kedokteran Hewan.* 21: 116-120.
- Smith TP, Grosse WM, Freking BA, Roberts AJ, Stone RT, Casas E, Wray JE, White J, Cho J, Fahrenkrug SC, Bennett GL, Heaton MP, Laegreid WW,

Rohrer GA, Chitko-McKown CG, Pertea G, Holt I, Karamycheva S, Liang F, Quackenbush J and Keele JW. 2001. Sequence evaluation of four pooled-tissue normalized bovine cDNA libraries and construction of a gene index for cattle. *Genome Res.* 11: 626-630.

9

Zhu X and Naz RK. 1999. Comparison of ZP3 protein sequence among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Frontiers in Bioscience.* 4: 212-225.

Perbandingan Sekuen Nukleotid gZP3 terhadap Sekuen Konsensus Nukleotid ZP3 Wanita dan Beberapa Spesies untuk Pengembangan Bahan Imunokontrasepsi

ORIGINALITY REPORT

19%

SIMILARITY INDEX

19%

INTERNET SOURCES

10%

PUBLICATIONS

0%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	academic.oup.com Internet Source	3%
2	www.journal.unair.ac.id Internet Source	2%
3	lgu.umd.edu Internet Source	2%
4	spms.unair.ac.id Internet Source	2%
5	achieve.nig.ac.jp Internet Source	1%
6	sinta3.ristekdikti.go.id Internet Source	1%
7	garuda.ristekdikti.go.id Internet Source	1%
8	molehr.oxfordjournals.org Internet Source	1%

jvcp.iaut.ac.ir

9	Internet Source	1 %
10	www.ricercaitaliana.it Internet Source	1 %
11	es.scribd.com Internet Source	1 %
12	Estu Nugroho, Sri Sundari, Nunung Nur Rachman. "VARIASI GENETIK IKAN JELAWAT HASIL BUDIDAYA DAN TANGKAPAN ALAM DI PONTIANAK DENGAN MENGGUNAKAN MARKER DNA-RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHISM DNA)", Media Akuakultur, 2010 Publication	1 %
13	onlinelibrary.wiley.com Internet Source	1 %
14	Submitted to Universitas Airlangga Student Paper	<1 %
15	complete.bioone.org Internet Source	<1 %
16	unair.ac.id Internet Source	<1 %
17	media.neliti.com Internet Source	<1 %
18	www.freepatentsonline.com Internet Source	<1 %

<1 %

19

phupyhu.wordpress.com

Internet Source

<1 %

20

text-id.123dok.com

Internet Source

<1 %

21

123dok.com

Internet Source

<1 %

22

mafiadoc.com

Internet Source

<1 %

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On