

Potensi Protein Reseptor Fertilisasi Zona Pelusida Kambing Sebagai Kandidat Imunokontrasepsi dengan Fertilisasi *in vitro* pada Sapi

(POTENTIAL OF FERTILIZATION RECEPTOR PROTEIN GOAT ZONA PELLUCIDA AS CANDIDATE OF IMMUNOCONTRACEPTION BY USING *IN VITRO* FERTILIZATION OF COW)

Sri Mulyati, Imam Mustofa, Laba Mahaputra

Departmen Reproduksi Veterinar, Fakultas Kedokteran Hewan,
Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo Surabaya 60115,
Telp.+62315992377, Fax +62315993015, Email : srimulyati_s3unair@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian tentang imunokontrasepsi telah dilaksanakan pada zona pelusida glikoprotein-3 (ZP3) beberapa spesies, termasuk pada ZP3 kambing (gZP3). Pada penelitian sebelumnya protein gZP3 efektif mencegah kebuntingan pada mencit. Penelitian ini bertujuan membuktikan adanya reaksi silang protein gZP3 untuk menghambat fertilisasi *in vitro* pada sapi. Antibodi gZP3 diproduksi pada mencit (*Mus musculus*). Serum mencit hasil imunisasi dianalisis dengan teknik ELISA dan Dot blot. Spermatozoa yang berasal dari semen beku dilakukan pemrosesan sampai dengan inkubasi dalam media kapasitasi yang diberi suplemen protein gZP3, sedangkan maturasi oosit sapi dilakukan secara *in vitro* dalam media yang telah ditambahkan antibodi gZP3. Selanjutnya masing-masing fertilisasi *in vitro* dilakukan secara terpisah dengan oosit dan spermatozoa dengan perlakuan standar (tanpa penambahan antibodi gZP3 atau protein gZP3 ke dalam media). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, titer antibodi serum mencit yang diimunisasi dengan gZP3 secara statistik nyata lebih tinggi ($p < 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol. Analisis Dot blot menunjukkan bahwa antibodi mencit yang telah diimunisasi dengan gZP3 dapat mengenali protein gZP3. Serum mencit yang telah diimunisasi dengan gZP3 yang disuplementasikan dalam media maturasi oosit mampu menurunkan angka *cleavage* ($p < 0,05$). Protein gZP3 yang ditambahkan ke dalam media kapasitasi spermatozoa juga menurunkan angka *cleavage* ($p < 0,05$). Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa protein gZP3 dapat bereaksi silang dalam mencegah fertilisasi *in vitro* pada sapi.

Kata kunci: zona pelusida 3, kambing, fertilisasi, *in vitro*

ABSTRACT

Studies on the role of zona pellucida glycoprotein-3 (ZP3) in immunocontraception have been conducted in many species including goats (gZP3). Our previous study indicated that gZP3 effective in preventing pregnancy in mice. The aim of this study was to prove the evidence of cross reaction in gZP3 to prevent fertilization in cow *in vitro*. Antibody of gZP3 was produced in mice. Immunized mice serum was analyzed using ELISA technique and dot blot method. Sperm from frozen semen were processed then incubated in capacitation media supplemented with the gZP3, whilst the cow oocyte was incubated in maturation media supplemented with antibody of gZP3. Following this, the normal *in vitro* fertilization (without incubation neither in gZP3 nor in gZP3 antibody) was performed, respectively. The results showed that antibody titer of immunized mice serum was higher ($p < 0.05$) than the control group. Dot blotting analysis showed that the antibody of immunized mice were able to recognize gZP3 protein. The serum of immunized mice which was supplemented in the maturation media of cow oocyte were able to decrease the cleavage rate ($p < 0.05$). Protein gZP3 which was supplemented in the capacitation media of the sperm also could decrease the cleavage rate ($p < 0.05$). It is concluded that goat-ZP3 protein may produce cross reaction in cow.

Key words: goat, zona pellucida-3, fertilization, cow.

PENDAHULUAN

Penelitian tentang imunokontrasepsi dilakukan dalam rangka menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi. Antibodi yang dihasilkan oleh protein imunokontrasepsi dalam tubuh akseptor diharapkan berperan mencegah pengenalan antara spermatozoa dengan oosit, sehingga pembuahan dapat dicegah. Bahan imunokontrasepsi yang potensial adalah zona pelusida-3 (ZP3), sebab ZP3 merupakan protein reseptor pengenalan oosit oleh spermatozoa (McCartney dan Mate, 1999 ; Sumitro dan Aulani'am, 2001).

Protein ZP3 beberapa spesies telah diteliti, namun sampai saat ini belum ada hasil akhir yang siap diterapkan pada masyarakat. Hal ini disebabkan masih ditemukannya efek samping dalam pengujian menggunakan hewan coba. Terjadinya efek samping tersebut dilaporkan Paterson *et al.*, (1999), yaitu patologi ovarium yang ditandai dengan gangguan folikulogenesis dan penekanan terhadap *primordial follicle pool*. Kerr *et al.*, (1998) dan Hasegawa *et al.*, (2002) juga melaporkan hal serupa pada pemakaian ZP sapi atau babi. Patologi ovarium tersebut menyebabkan perubahan profil hormon estrogen maupun progesteron, yang selanjutnya akan menimbulkan perubahan siklus berahi, bahkan percepatan penurunan jumlah folikel primordial yang bersifat *irreversibel*. Pada wanita, penurunan jumlah folikel primordial secara *irreversibel* akan menyebabkan menopause dini (Paterson *et al.*, 2002). Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi reseptor fertilisasi (ZP3) pada berbagai spesies untuk mendapatkan bahan imunokontrasepsi yang ideal.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa imunisasi *goat* ZP3 (gZP3) pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) tidak menimbulkan perubahan siklus berahi (Mulyati *et al.*, 2003), tidak memengaruhi histologi ovarium (Mustofa, 2005), dan tidak mengubah profil hormon progesteron (Mulyati *et al.*, 2006). Sebagai kandidat iminokontrasepsi, gZP3 efektif mencegah kebuntingan (Mustofa *et al.*, 2004b) dan bersifat reversibel (Mustofa, 2006). Penelitian yang membandingkan sekuens nukleotida gZP3 dengan sekuens nukleotida ZP3 manusia (*human zona pellucida-3*, hZP3) dan beberapa spesies lain yang memiliki kekerabatan terdekat, menunjukkan bahwa sekuens nukleotida ZP3 kambing (gZP3) memiliki homolog sebesar 49,74% terhadap sekuens

nukleotida ZP3 sapi (*bovine zona pellucida-3*, bZP3) (Mustofa dan Herupradoto, 2011). Sehubungan dengan hal tersebut, maka penelitian ini bertujuan untuk menguji potensi imunokontraseptif gZP3 pada oosit dan spermatozoa sapi menggunakan teknik fertilisasi *in vitro*. Dengan diketahuinya potensi imunokontraseptif tersebut pada spesies lain (sapi) yang secara filogenik lebih tinggi daripada hewan coba sebelumnya (mencit), memungkinkan kelak protein gZP3 dapat diteliti lebih lanjut untuk penerapannya sebagai bahan imunokontrasepsi pada wanita.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan yaitu kontrol, suplementasi antibodi gZP3 pada medium maturasi oosit *in vitro*, dan suplementasi protein gZP3 pada medium kapasitasi spermatozoa *in vitro*. Masing-masing perlakuan selanjutnya diproses dalam prosedur standar teknik fertilisasi *in vitro*.

Isolasi gZP3

Ovarium kambing diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirikan, Surabaya. Folikel-folikel pada ovarium diaspirasi menggunakan *disposable syringe* ukuran 18 Gauge (G) berisi *phosphate buffer saline* (PBS). Sel-sel kumulus dihilangkan, kemudian zona pelusida dipecah menggunakan dua jarum tuberkulin dalam pengamatan mikroskop *disecting* untuk mengeluarkan vitelusnya. Zona pelusida dicuci tiga kali dalam PBS dan difraksinasi dengan *ultrasonic homogenizer*. Elektroforesis dengan *sodium dodecil sulphuric acid – polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) 12% dilanjutkan dengan isolasi protein gZP3 (Mustofa *et al.*, 2004a).

Pembuatan Antibodi gZP3

Sepuluh ekor mencit (*M. musculus*) betina galur Balb-C berumur 3,0-3,5 bulan dengan bobot 25-30 gram diimunisasi menggunakan 40 mg protein gZP3 dalam *Freund adjuvant* dengan dua kali *booster* interval 14 hari. Sebagai kontrol, digunakan sepuluh ekor mencit betina disuntik dengan larutan garam fisiologis bersamaan dengan saat imunisasi. Contoh darah diambil tujuh hari setelah *booster* terakhir. Analisis titer antibodi serum dilakukan dengan ELISA.

Dot Blot

Dot blotting dilakukan dengan metode De Maio (1994). Protein gZP3 dibuat dengan konsentrasi 0,15, 0,12, 0,09, dan 0,06 mg/mL, sedangkan antibodi primer (serum mencit perlakuan) diencerkan 1/25 dan 1/50. Antibodi sekunder menggunakan *conjugate anti mouse IgG* terlabel *alkaline phosphatase* dan pewarnaan menggunakan *western blue*.

Fertilisasi *in vitro*

Maturasi Oosit. Ovarium sapi peranakan ongole (PO) diambil dari RPH Pegirikan Surabaya. Folikel berdiameter 2-5 mm diaspirasi dengan *disposable syringe* 18 Gauge (G) berisi *oocyte washing solution* (OWS). Komposisi per mL OWS adalah NaCl 6,70 µg, KCl 0,30 µg, CaCl₂.H₂O 0,13 µg, NaH₂PO₄.2H₂O 0,13 µg, MgCl₂.6H₂O 1,05 µg, NaHCO₃ 0,70 µg, Na pyruvate 0,00135 µg, penicillin 100 IU, streptomycin 0,1 µg, bovine serum albumine 10 µg, phenol red 0,05 µg. Oosit-kumulus-kompleks (OKK) yang terkumpul dicuci dengan OWS tiga kali dan terakhir dengan media maturasi.

Proses maturasi oosit dilakukan dengan memasukkan 10 buah OKK ke dalam masing-masing 50 µL *droplet* media maturasi yang telah ditutup minyak parafin. Komposisi per mL media maturasi adalah *tissue culture medium*/TCM199 0,95 µg, bovine serum albumine 0,05 µg, Penicilline 100 IU, dan Streptomycine 0,1 µg. Media maturasi kelompok perlakuan disuplementasi dengan 10% serum yang mengandung antibodi gZP3. Inkubasi dilakukan selama 24 jam dalam inkubator 5% CO₂ dengan temperatur 38,5° C dan kelembaban 95-99% (Mahaputra *et al.*, 1998 ; Mahaputra dan Mustofa, 2000).

Preparasi Spermatozoa. *Droplet Earle's Balanced Salt Solution* (EBSS) 50 mL dalam cawan petri, dimasukkan inkubator. Pada kelompok perlakuan, media EBSS mengandung 10% suspensi protein gZP3. *Straw* semen beku sapi di-*thawing*, kemudian dilakukan pencucian spermatozoa dalam EBSS dengan cara sentrifugasi 700 g selama 10 menit berulang dua kali. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang, selanjutnya *pellet* spermatozoa ditambahkan 3 mL EBSS. Tabung didiamkan 30 menit dalam inkubator 5% CO₂ dengan temperatur 38,5° C untuk proses *swimp up*. Suspensi spermatozoa pada bagian atas tabung diambil, kemudian konsentrasinya dibuat menjadi 1,2 juta/40 µL dengan menambahkan EBSS. Sebanyak 40 µL

campuran sel spermatozoa ini dimasukkan kedalam *droplet*, selanjutnya kembali diinkubasi selama satu jam untuk proses kapasitasasi (Mahaputra dan Mustofa, 2001).

Inseminasi *in vitro*. Oosit kumulus kompleks matang dicuci tiga kali dengan OWS serta sekali dengan EBSS, kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing *droplet* media yang berisi spermatozoa yang telah mengalami kapasitasasi. Inkubasi dilakukan selama 48 jam, setiap 24 jam media digoyang agar embrio tidak melekat pada sel-sel kumulusnya. Pemeriksaan embrio stadium *cleavage* dilakukan pengamatan dengan mikroskop stereo pada pembesaran 40 kali.

Tolok ukur untuk menentukan hambatan terjadinya pembuahan adalah berdasarkan penurunan angka *cleavage* hasil fertilisasi *in vitro* secara nyata ($p < 0,05$). 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 2-32 sel blastomer tanpa disertai penambahan volume embrio (Gordon, 1994 ; Bongso dan Gardner, 2000).

Analisis Statistika

Data berupa titer antibodi dianalisis dengan uji t, sedangkan angka *cleavage* diuji dengan Chi-kuadrat. Uji statistika menggunakan program aplikasi statistik SPSS for Windows pada tingkat kepercayaan 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer Antibodi gZP3

Hasil elektroelusi diperoleh suspensi protein gZP3 dengan kadar 290,547 µg /mL. Suspensi isolat gZP3 tersebut dipakai sebagai imunogen dengan dosis 40 µg gZP3 untuk mendapatkan antibodi gZP3 mencit. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa dosis 40 µg gZP3 menghasilkan angka infertilitas 100% pada mencit (Mustofa *et al.*, 2004b). Menurut Lee dan Chi (1985), suatu bahan berpengaruh efektif sebagai antifertilitas apabila menyebabkan kegagalan fertilisasi lebih dari 60%.

Terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) titer antibodi serum antara mencit kelompok perlakuan imunisasi dengan 40 µg protein gZP3 dibandingkan dengan kelompok kontrol (Tabel 1). Kelompok perlakuan menghasilkan rata-rata

titer antibodi sebesar 640, enam belas kali lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol yang menunjukkan adanya titer antibodi $44 \pm 12,65$.

Mustofa *et al.*, (2007) melaporkan bahwa dengan ELISA protein gZP3 dikenali oleh serum wanita usia subur dengan rata-rata titer antibodi $496 \pm 231,86$. Pada penelitian ini serum mencit betina kontrol dikenali oleh protein gZP3 dengan rata-rata titer antibodi $44 \pm 12,65$. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam serum hewan coba tersebut terdapat klon imonoglobulin G (IgG) yang dikenali oleh epitop peptida pada *back bone serine / threonine* atau pada glikan Gal – (1,3) – GalNAc pada gZP3. Menurut Zhu dan Naz (1999), terdapat homologi susunan asam amino ZP3 antar spesies. Dikenalnya protein gZP3 oleh serum mencit kontrol tersebut menunjukkan adanya homologi susunan asam amino antara gZP3 dengan ZP3 mencit (*mice zona pellucida-3, mZP3*).

Dot Blotting

Analisis *Dot blot* dimaksudkan untuk memastikan bahwa antibodi yang ada pada serum mencit perlakuan adalah benar-benar spesifik antibodi gZP3. Pengenalan antibodi gZP3 dengan protein gZP3 ditandai dengan noda berwarna abu-abu keunguan (warna *Western blue*). Antibodi gZP3 asal serum mencit sebagai perlakuan (sub kolom P) dapat mengenali protein gZP3. Pada kontrol (sub kolom K) tidak menunjukkan adanya pengenalan antigen-antibodi. Gradasi warna pada noda dipengaruhi oleh variasi konsentrasi antigen protein gZP3

dan pengenceran antibodi gZP3. Konsentrasi antigen protein gZP3 dan antibodi gZP3 yang lebih kecil menghasilkan gradasi warna lebih terang. Pada analisis *Dot blot*, diketahui terdapat reaksi positif pengenalan antibodi gZP3 asal mencit betina perlakuan dengan protein gZP3 (Gambar 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum mencit hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3. Menurut Rantam (2003) antibodi poliklonal yang mempunyai afinitas, aviditas, dan spesifisitas yang tinggi terhadap antigen, menghasilkan gradasi warna noda yang tajam pada *Dot blot*.

Fertilisasi *in vitro*

Teknologi fertilisasi *in vitro* terdiri dari beberapa tahapan, yaitu maturasi oosit, kapasitas spermatozoa, dan inseminasi *in vitro*. Oleh karena itu pengujian imunokontrasepsi menggunakan teknik fertilisasi *in vitro* dapat dilakukan pada tahapan maturasi oosit jika target imunokontrasepsinya adalah oosit (Hasegawa *et al.*, 2002) atau pada tahap kapasitas spermatozoa apabila target imunokontrasepsinya adalah spermatozoa (Naz dan Zhu, 1998 ; Ramalho-Santos *et al.*, 2000). Pada penelitian ini pengujian hambatan fertilisasi secara *in vitro* dilakukan pada oosit dan spermatozoa sapi (Tabel 2 dan Gambar 2).

Pada kelompok kontrol didapatkan angka *cleavage* sebesar 60% (12/20). Hasil tersebut tidak berbeda jauh dengan penelitian sebelumnya di laboratorium yang sama.

Tabel 1. Titer Antibodi Mencit setelah Imunisasi dengan *goat zona pellucida 3*

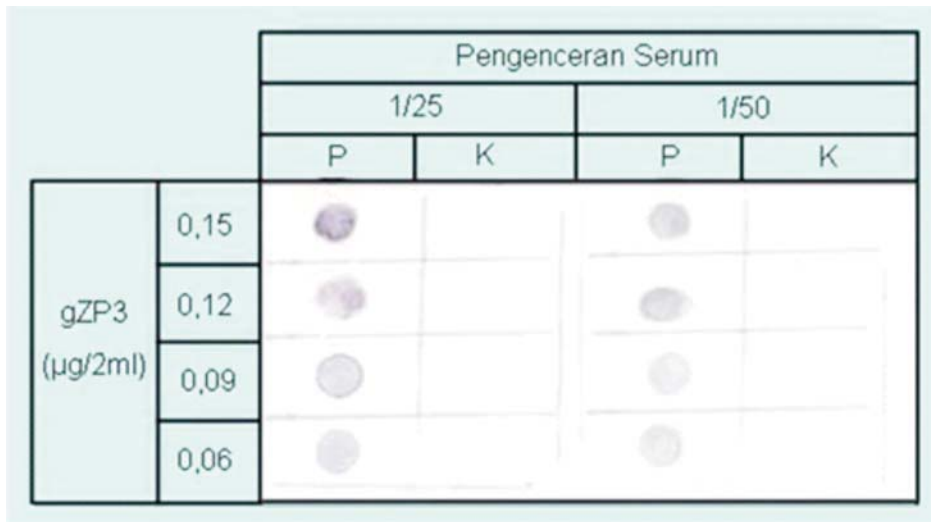
Perlakuan	Rentangan	Rataan ± Simpangan Baku
Kontrol	40 – 80	$44 \pm 12,65^a$
40 mg	640 – 640	$640 \pm 0,00^b$

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

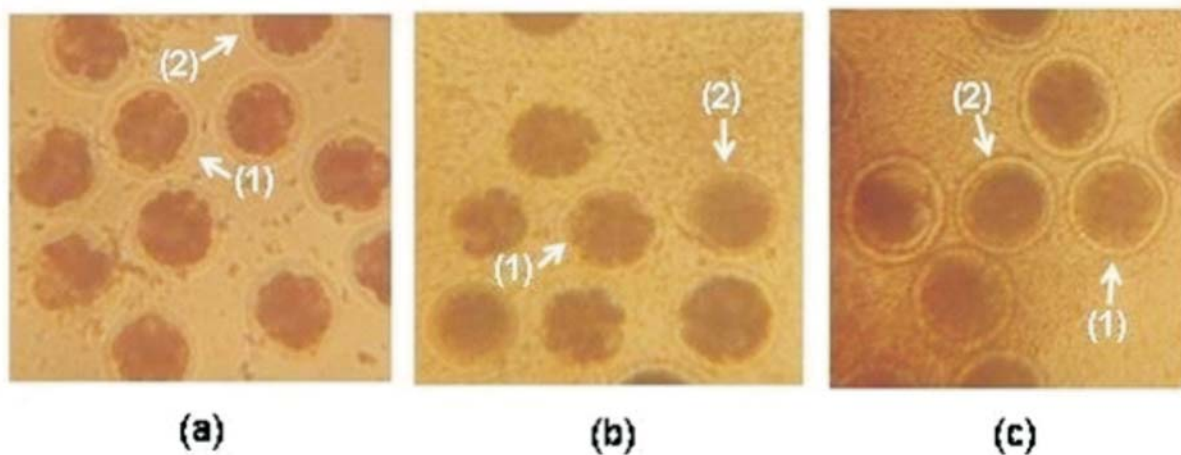
Tabel 2. Angka *cleavage* embrio sapi setelah perlakuan suplementasi antibodi *goat zona pellucida* pada media maturasi oosit dan suplementasi protein gZP3 pada media kapasitas spermatozoa

Perlakuan	<i>Cleavage</i>	<i>Non Cleavage</i>	Jumlah
Kontrol	12 (60%)	8 (40%)	20 (100%)
gZP3 pada Kapasitas Spermatozoa	1 (7,69%)	12 (92,31%)	13 (100%)
Antibodi gZP3 pada Maturasi Oosit	41 (45,55%)	49 (54,45%)	90 (100%)

Chi-kuadrat (X^2) = 9.125, $p = 0,0104$.



Gambar 1. Hasil analisis dot blot antibodi gZP3 (AbgZP3) asal mencit terhadap protein gZP3. (Keterangan : K : Kontrol, P : Perlakuan).



Gambar 2. Embrio hasil fertilisasi *in vitro* sapi dengan perlakuan : (a) Kontrol, (b) Maturasi oosit dalam media yang mengandung antibodi gZP3, dan (c) Kapasitas spermatozoa dalam media yang mengandung protein gZP3. Keterangan : (1) embrio stadium *cleavage* (2) oosit gagal fertilisasi.

Mustofa *et al.*, (1999) melaporkan angka *cleavage* sebesar 58,71% dengan suplementasi 10% serum sapi *Friesian Holstein* (FH) berahi pada media maturasi oosit. Angka *cleavage* sebesar 75% dicapai dengan suplementasi media maturasi oosit dengan kombinasi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH)-*Luteinizing Hormone* (LH)-Estrogen (Mahaputra dan Mustofa, 2002).

Penambahan 10% serum mencit dengan titer antibodi gZP3 640 masih menghasilkan angka *cleavage* sebesar 45,55% (41/90), namun angka tersebut lebih kecil dibandingkan angka *cleavage* kelompok kontrol. Pengujian imunokontrasepsi menggunakan teknik

fertilisasi *in vitro* pada penelitian sebelumnya (Naz dan Zhu, 1998) juga tidak dapat mencegah fertilisasi 100%. Rankin *et al.*, (2001) menguji peranan masing-masing komponen ZP (ZP1, ZP2, dan ZP3) mencit dengan fertilisasi *in vitro* ternyata menghasilkan perkembangan embrio (dua sel sampai stadium blastosis) berkisar antara 30 sampai 61%.

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. Menurut Barber dan Fayrer-Hosken (2000), hewan coba yang diimunisasi dengan substansi yang berasal dari zona pelusida, kadar imonoglobulin G (IgG) dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. Penelitian secara *in vivo*, imunisasi mencit dengan beberapa dosis gZP3 menunjukkan terjadinya infertilitas yang bersifat tergantung dosis (*dose dependent*) (Mustofa *et al.*, 2004b). Pada fertilisasi *in vitro* juga menunjukkan hambatan fertilisasi yang bersifat *dose dependent* terhadap persentase serum yang disuplementasikan pada media (Jewgenow *et al.*, 2000). Antibodi gZP3 efektif menghambat terjadinya ikatan antara spermatozoa dengan zona pelusida dalam *binding assay* (Mustofa *et al.*, 2006a), dan menghambat fertilisasi pada uji *in vitro* (Mustofa *et al.*, 2006b). Terjadinya embrio stadium *cleavage* pada penelitian ini menandakan bahwa secara kuantitatif titer antibodi dalam media belum mampu menutup seluruh reseptor fertilisasi pada zona pelusida sapi.

Antibodi ZP3 akan terikat pada glikoprotein ZP3 oosit (Barber dan Fayrer-Hosken, 2000). Agar dapat menutup reseptor fertilisasi pada zona pelusida maka ikatan antibodi tersebut membutuhkan afinitas dan aviditas yang tinggi. Hal itu diperoleh apabila imunisasi dilakukan pada hewan betina secara berulang. Menurut Goldsby *et al.*, (2000), respons imun terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas, serta spesifisitas yang tinggi. Ikatan dengan afinitas, aviditas dan spesifisitas yang tinggi juga terjadi antara antibodi yang berasal dari suatu spesies dengan oosit spesies yang sama. Pada penelitian ini antibodi dibuat pada mencit, dipakai untuk mencegah fertilisasi pada oosit sapi PO, sehingga afinitas, aviditas dan spesifisitasnya rendah yang berakibat masih ada peluang untuk terjadinya fertilisasi dan berlanjut pada perkembangan embrio tahap *cleavage*.

Penambahan protein gZP3 10% (29 µg gZP3/mL) dalam media kapasitasi spermatozoa sapi, menghasilkan angka *cleavage* sebesar 7,69% (1/13) (Tabel 1). Naz dan Zhu (1998) menggunakan teknik fertilisasi *in vitro* untuk menguji hambatan fertilisasi pada mencit yang telah diimunisasi dengan protein spermatozoa menghasilkan fertilisasi antara 0-4,8%, sedangkan Ramalho-Santos *et al.*, (2000) melakukannya pada oosit sapi dengan

keberhasilan fertilisasinya hanya 17-63%.

Pada membran plasma spermatozoa terdapat sejumlah protein *multi ligand* yang berperan untuk berikatan dengan *multi receptor* pada ZP3 (Thaler dan Cardullo, 1996). 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. Untuk memblok *egg binding* protein pada membran plasma spermatozoa dibutuhkan protein dengan konformasi yang tepat sebagaimana *lock-key system* dengan epitop membran plasma spermatozoa. Struktur tiga dimensi protein gZP3 tidak sama persis dengan ZP3 sapi, meskipun diyakini terdapat homologi susunan asam amino di antara keduanya. Hal tersebut berarti masih ada peluang terjadinya fertilisasi, sehingga hanya menurunkan angka fertilisasi yang pada penelitian ini diamati berdasarkan angka *cleavage*, tidak sampai mencegah fertilisasi 100%.

SIMPULAN

Isolat protein gZP3 imunogenik pada mencit merangsang dihasilkannya antibodi yang dapat dikenali oleh protein gZP3. Antibodi gZP3 asal serum mencit yang disuplementasikan pada media maturasi *in vitro* oosit sapi menghambat fertilisasi. Isolat protein gZP3 yang disuplementasikan pada media kapasitasi spermatozoa sapi menghambat fertilisasi secara *in vitro*. Protein gZP3 bersifat imunokontra-septif pada sapi.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menemukan susunan asam amino gZP3 yang homolog dengan susunan asam amino ZP3 manusia dan mengujinya dengan teknik *human sperm-oocyte binding assay* atau *human hemi zona assay*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian Prof.Dr. Imam Mustofa, drh.,

M.Kes., untuk itu kepadanya disampaikan ucapan terimakasih. Ucapan terimakasih juga disampaikan kepada Dr. Suwarno, drh., M.Si., yang telah membantu teknik ELISA dan Dot blot, Helen Susilowati, yang telah membantu isolasi protein gZP3, dan Ida Prasetyowati yang telah membantu fertilisasi *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Barber MR, Fayerer-Hosken A. 2000. Possible mechanism of mammalian immunocontraception. *J Reprod Immunol* 46 : 103-124.
- Bongso A, Gardner DK. 2000. Embryo development. In : Trounson AO, Gardner DK (Eds). *Handbook of In vitro Fertilization*. 2nd Ed. Washington DC CRC Press.
- De Maio A. 1994. Protein Blotting and Immunoblotting Using Nitrocellulose Membrane, In : Dunbar BS (Ed), *Protein Blotting, A Practical Approach*. Oxford University Press. Pp : 11-29.
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. 2000. *Kuby immunology*. 4th Ed. New York : WH Freeman and company. Pp 10-15.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge, Cambridge University Press. Pp : 231-233.
- Hasegawa A, Hamada Y, Shigeta M, Koyama K. 2002. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA). *J Reprod Immunol* 53 : 91-98.
- Jewgenow K, Rohleder M, 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, Aitken RJ. 1998. Molecular basis of sperm-egg interaction and the prospect for immunocontraception. *J Reprod Immunol* 40 : 103-118.
- Lee EB, Chi CH. 1985. *Female Infertility Evaluation of Natural Products*. Proceeding from the UNESCO Regional Workshop. Seoul. Pp : 18-22.
- Mahaputra L, Hinting A, Mustofa I, Utama S. 1998. Aplikasi transfer embrio beku hasil fertilisasi *in vitro* untuk membuat kebuntingan kembar fraternal pada resipien sapi friesian holstein. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga* 6(2) : 43-48.
- Mahaputra L, Mustofa I. 2000. Pemanfaatan teknologi bayi tabung untuk mengembangkan bank embrio sapi Madura. *Media Kedokteran Hewan* 16(3) : 145-150.
- Mahaputra L, 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, Mustofa I. 2002. Kinerja serum sapi berahi dan kuda berahi sebagai suplemen media maturasi oosit pada fertilisasi *in vitro* sapi madura. *Jurnal Biosains Pascasarjana* 4(3) : 113-117.
- McCartney CA, 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.
- Mulyati S, Mustofa I, Utama S. 2003. Pengaruh zona pelusida fraksi 3 (zp3) kambing sebagai bahan antifertilitas terhadap siklus berahi mencit (*M. musculus*). *Media Kedokteran Hewan* 19(1) : 17-20.
- Mulyati S, Mustofa I, Mahaputra L. 2006. Siklus Berahi dan Kadar Progesteron dalam Serum Mencit (*Mus musculus*) Sebelum dan Setelah Imunisasi dengan Bahan Antifertilitas Zona Pelusida-3 (ZP3) Kambing. *Media Kedokteran Hewan* 22 (1) : 51-56.
- Mustofa I. 2005. Identifikasi efek samping imunokontrasepsi zona pelusida-3 kambing pada histologis ovarium mencit (*M. musculus*) sebagai model. *Media Kedokteran Hewan* 21 (1) : 19 – 22.
- Mustofa I. 2006. Uji Reversibilitas Imunokontrasepsi Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) pada Mencit (*Mus musculus*) sebagai Hewan Model. *Hayati* 13 (4) : 173-176.
- Mustofa I, Mahaputra L, Utama S. 1999. Identifikasi kinerja serum sapi FH dan kuda berahi dalam media maturasi oosit terhadap perkembangan sigot sapi Madura. *Jurnal Penelitian Universitas Airlangga* 7 (2) : 42-51.
- Mustofa I, Mahapura L, Rantam FA, Restiadi TI. 2004a. Isolasi zona pelusida - 3 kambing dan identifikasi karakter reseptor fertilisasi dengan uji imunofluoresen. *Media Kedokteran Hewan* 20 (3) : 116 - 120.
- Mustofa I, Mulyati S, Mahaputra L. 2004b. Pengaruh imunisasi dengan zona pelusida - 3 kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah anak pada mencit (*M. musculus*). *Media Kedokteran Hewan* 20 (1):

- 22 – 25.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Suwarno, Widjiati. 2006a. Konfirmasi Potensi Immunokontrasptif Antibodi Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) dengan Teknik Binding Assay pada Oosit Mencit (*Mus musculus*) sebagai Model. *Jurnal Medis Veteriner Indonesia* 10 (1) : 5-11.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Rantam FA, Suwarno, Widjiati, Hinting A. 2006b. Antibodi Protein Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) Asal Mencit (*Mus Musculus*) Mencegah Fertilisasi in vitro Oosit Mencit sebagai Hewan Model. *Jurnal Sains Veteriner* 24 (1) : 42-48.
- Mustofa I, Suwarno, Utama S. 2007. Protein gZP3 Sebagai Kandidat Bahan Immunokontrasepsi Dikenali oleh Serum Wanita Fertl dengan Analisis Elisa dan Dot Blot. *Majalah Ilmu Faal Indonesia* 6 (2) : 79-87.
- Mustofa I, Herupradoto EBA. 2011. Perbandingan sekuens nukleotid gZP3 terhadap sekuens konsensus nukleotid zp3 wanita dan beberapa spesies untuk pengembangan bahan immunokontrasepsi. *Media Kedokteran Hewan* 27 (2): 123-126.
- Naz RK, Zhu X. 1998. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol Reprod* 59 : 1095–1100.
- Paterson M, Wilson MR, Jennings ZA, van Duin M, Aitken RJ. 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homolo-gous primate model. *Mol Hum Reprod* 5 (4) : 342-52.
- Paterson M, Wilson MR, Jennings ZA, Aitken RJ. 2002. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J Reprod Immunol* 53 : 99–107.
- Ramalho-Santos JA, Moreno RD, Sutovsky P, Chan AW, Hewitson L, Wessel GM, Simerly CR, Schatten G. 2000. SNAREs in mammalian sperm : possible implications for fertilization. *Dev Biol* 223 : 54–69.
- Rankin TL, O'Brien M, Lee E, Wigglesworth K, Eppig J, Dean J. 2001. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Dev Biol* 128 : 1119-1126
- Rantam FA. 2003. *Metode Immunologi*. Surabaya. Airlangga University Press. Halaman 147-153.
- Sumitro SB, 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.
- Thaler CD, Cardullo RA. 1996. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. *Biol Reprod* 66 : 65-69.
- Zhu X, Naz RK. 1999. Comparison of ZP3 protein sequence among vetrebrate species : to obtain a concensus sequence for immunocontraception. *Frontiers in Bioscience* 4 : 212-225.