

Identifikasi Protein Reseptor Fertilisasi (ZP3) pada Zona Pelusida Kambing sebagai Kandidat Bahan Imunokontrasepsi dengan Teknik Fertilisasi in Vitro

(Identification of Fertilization Receptor Protein (ZP3) on Goat Zona Pellucida as Candidate of Immunocontraceptive Substance Using in Vitro Fertilization Technique)

Imam Mustofa*, L. Mahaputra* , Yoes Prijatna Dachlan**

ABSTRACT

*The researches of immunocontraception have been 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 effects. In preliminary study, a crude of goat zona pellucida protein was effective prohibited graviditation of mice. The aim of this study was to prove that obtained gZP3 protein isolate was representing receptor of goat 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. Antibody of gZP3 produce on rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). The first immunization, gZP3 suspension was mixed with Complete Freund's Adjuvant (CFA) 1:1 (v/v) followed by boosters twice with the interval of 11 days, the suspension was mixed with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) 1:1 (v/v). In in-vitro fertilization technique, antibody of gZP3 which was supplemented media during maturation process of goat oocytes in vitro had decreased ($p < 0.05$) embryos cleavage rate. Protein of gZP3 which was supplemented in the capacitation media of goat sperms decreased ($p < 0.05$) of cleavage rate. Based on these results, it was concluded that antibody gZP3 having a fertilization receptor protein at the goat zona pellucida.*

Key words: goat zona pellucida-3, in vitro fertilization

PENDAHULUAN

Penelitian tentang imunokontrasepsi ditujukan untuk menemukan bahan yang dapat menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi bagi pasangan usia subur. Penyuntikan bahan imunokontrasepsi diharapkan menghasilkan antibodi yang berperan mencegah pengenalan gamet, sehingga mencegah fertilisasi. Di antara kandidat bahan imunokontrasepsi, zona pelusida-3 (ZP3) merupakan antigen yang potensial untuk target imunokontrasepsi (McCartney and Mate, 1999; Sumitro and Aulani'am, 2001).

Zona pelusida yang telah diteliti adalah ZP3 babi (*porcine zona pellucida*-3, pZP3) dan ZP3 sapi (*bovine zona pellucida*-3, bZP3) (Sumitro and Aulani'am, 2001). Beberapa zona pelusida spesies lain yang telah 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 and Dean, 2000). Protein zona pelusida tersebut diimmunisasikan pada hewan coba

dalam bentuk ZP3 natif (Paterson et al., 1999), protein ZP3 rekombinan (Paterson et al., 2002), maupun protein ZP3 terdeglisosilasi (Henderson et al., 1987a; Henderson et al., 1987b; Dunbar et al., 1989; Milletich and Goze, 1990; Paterson et al., 1992; Aulanni'am, 2003; Aulanni'am et al., 2003). Namun, sampai saat ini belum ada hasil akhir penelitian yang siap diimplementasikan. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi reseptor fertilisasi (ZP3) pada berbagai spesies untuk mendapatkan bahan kontrasepsi yang ideal. Penelitian eksploratif dan eksperimental menggunakan zona pelusida kambing, sampai saat ini belum ada pihak lain yang melakukan.

Penelitian sebelumnya telah berhasil mengisolasi dan karakterisasi protein gZP3 dengan teknik imunofluoresen (Mustofa dkk., 2004a). Penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa imunisasi gZP3 pada hewan coba mencit (*Mus musculus*) dapat mencegah kebuntingan (Mustofa dkk., 2004b). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah protein gZP3 hasil elektroforesis zona pelusida kambing

* Departemen Reproduksi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

** Tropical Disease Center Airlangga University.

mempunyai reseptor fertilisasi, pada oosit kambing dilakukan maturasi secara in-vitro.

MATERI DAN METODE

Isolasi gZP3

Isolasi protein gZP3 dilakukan sesuai dengan metode penelitian yang telah dilakukan oleh **Mustofa** dkk. (2004a). Ovarium kambing dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, Kota Surabaya. Ovarium diaspirasi folikel-folikelnya menggunakan alat yang berisi *phosphate buffer saline* (PBS). Oosit dibebaskan dari sel-sel kumulus dengan pemipetan, dicuci dari petri ke petri sebanyak tiga kali dengan PBS. Koleksi zona pelusida diperoleh dengan memecah secara manual untuk dikeluarkan isinya dengan pengamatan mikroskop *disecting* menggunakan dua jarum tuberkulin. Fraksinasi zona pelusida menggunakan *Ultrasonic Homogenizer*. Preparasi gZP3 dengan *sodium dodecil sulphuric acid – polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dilanjutkan dengan elektroelusi untuk isolasi protein gZP3.

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 preimun) dan tujuh hari setelah *booster* terakhir (sebagai serum postimun). Analisis titer antibodi dilakukan dengan Elisa indirek.

Uji Dot Blotting

Analisis *Dot blotting* dilakukan untuk memastikan bahwa antibodi pada serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 (AbgZP3). Metode *Dot blotting* dilakukan dengan metode **De Maio** (1994).

Pemrosesan Kering Beku Serum dan gZP3

Serum hewan coba setelah imunisasi (postimun) dan antigen protein gZP3 dikeringbekukan untuk memudahkan pemakaian dalam suplementasi media. Proses pengering bekuan dilakukan di Tropical Disease Center (TDC) Universitas Airlangga.

Suplementasi Media

Serum kelinci postimunisasi 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.

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). Tolok ukur untuk menentukan kegagalan 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 beberapa (2–32) sel blastomer tanpa disertai penambahan volume embrio (**Gordon**, 1994; **Bongso** and **Gardner**, 2000).

HASIL DAN DISKUSI

Titer Antibodi gZP3

Titer antibodi pada serum Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata ($p < 0,05$) antara sebelum imunisasi dengan setelah imunisasi (*Tabel 1*).

Tabel 1. Titer antibodi kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan gZP3

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

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

Menurut **Austyn** and **Wood** (2000), **Goldsby**, *et al.* (2000) and **Abbas**, *et al.* (2003), titer antibodi sebagai ukuran kuantitas respons imun atau imunogenisitas terutama dipengaruhi oleh faktor keasingan antigen oleh hospes. 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.

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 respons 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).

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 uji spesifisitas dengan metode *Dot blot* ditampilkan sebagai Gambar 1. 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 asal serum kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan sebagai perlakuan (subkolom P) dapat mengenali protein gZP3. Pada kontrol (subkolom K)

tidak menunjukkan adanya pengenalan antigen-antibodi. Gradasi warna pada noda dipengaruhi oleh variasi konsentrasi antigen protein gZP3, pengenceran antibodi gZP3. Konsentrasi antigen protein gZP3 dan antibodi gZP3 yang lebih kecil menghasilkan gradasi warna lebih terang, demikian pula sebaliknya.

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

Gambar 1. 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.

Pada *Dot blot* serum asal kelinci jantan tersebut di atas, 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. 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 and Mangkoewidjojo (1998), dalam pembentukan antibodi yang sangat spesifik, menghasilkan sifat antibodi yang afinitasnya relatif seragam, sehingga sensitivitasnya rendah.

Fertilisasi *in vitro*

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 and Zhu, 1998; Ramalho-Santos et al., 2000**).

Hasil penelitian disajikan pada *Tabel 2*. Visualisasi oosit matang dan embrio stadium *cleavage* terdapat pada *Gambar 2*. 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. Penelitian sebelumnya pada kelompok kontrol, angka *cleavage* pada fertilisasi *in vitro* sapi sebesar $38,9\%$ (**Mahaputra and 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.

Tabel 2. Angka *Cleavage* embrio kambing (%) setelah perlakuan penambahan antibodi gZP3 pada media maturasi oosit dan penambahan gZP3 pada media kapasitasasi spermatozoa

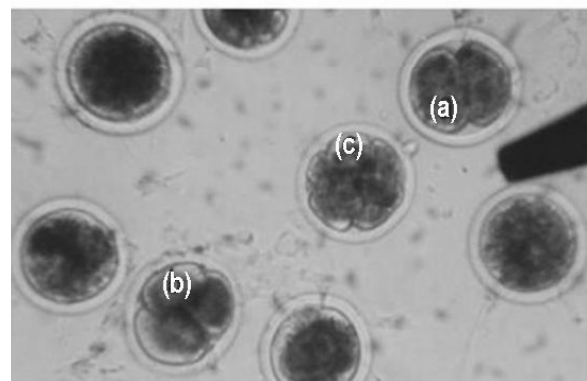
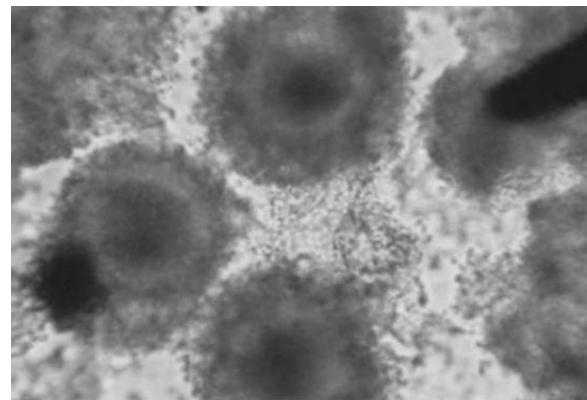
Perlakuan	Rentangan	Rerata $\pm$ Simpangan Baku
Kontrol	27,27–45,45	$38,07 \pm 5,23^a$
Antibodi gZP3 pada Maturasi Oosit	0,00–9,09	$4,26 \pm 3,78^b$
GZP3 pada Kapasitasi Spermatozoa	0,00–20,00	$9,58 \pm 6,70^c$

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

Penambahan antibodi sebesar 1024/ml dalam bentuk suplementasi 10% *post immune serum* asal kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang mengandung antibodi gZP3 dengan titer 10.240 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.

Pada zona pelusida terdapat sejumlah reseptor (ZP3) untuk pengenalan terhadap spermatozoa. Dengan teknik *Binding Assay*, **Thaler and Cardullo (1996)** menunjukkan bahwa terdapat *multiple receptor* pada zona pelusida yang dapat berikatan dengan *multiple ligand* pada permukaan membran plasma spermatozoa. Menurut **Barber and 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*) (**Mustofa dkk, 2004b**). Pada fertilisasi *in vitro* juga menunjukkan hambatan fertilisasi yang bersifat *dose dependent* terhadap persentase serum yang disuplementasikan pada media (**Jewgenow et al., 2000**). Data tersebut menggambarkan bahwa titer antibodi yang lebih tinggi memblokir lebih banyak reseptor, sehingga angka fertilisasi menurun.



Gambar 2. 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.

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 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 tertutup dengan sempurna, sehingga masih ada peluang terjadinya fertilisasi.

Penambahan gZP3 10% atau dengan kadar 13,16 μg 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 and Cardullo, 1996). Dengan model ikatan steril, penambahan 10% gZP3 (13,16 $\mu\text{g/ml}$) pada media kapasitasi spermatozoa 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. Untuk memblok *egg binding* protein pada membran plasma spermatozoa dibutuhkan protein dengan konformasi yang tepat pas sebagaimana *lock-key system* dengan epitop 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.*, 2002). 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*.

Simpulan

1. Isolat protein gZP3 imunogenik pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) jantan, menghasilkan antibodi spesifik yang dapat dikenali oleh protein gZP3 pada analisis Dot blot.
2. Isolat protein gZP3 penelitian ini merupakan reseptor fertilisasi kambing. Dalam uji identifikasi 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 kapasitasi spermatozoa kambing menghambat fertilisasi secara *in vitro*, sehingga menurunkan secara nyata ($p < 0,05$) angka *cleavage*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk:

1. Menemukan susunan asam amino gZP3 yang homolog dengan susunan asam amino ZP3 manusia (*Homo sapiens*) dan menguji potensi imunokontrasptif peptida tersebut pada primata dengan pengamatan pada efek

utama pada infertilitas dan efek samping pada siklus menstruasi dan perubahan histologi ovariumnya.

2. Menguji peptida tersebut di atas dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, AH. Lichtman, and JS Pober.** 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.
- Aulani²am, SB Sumitro, S Hardjopranto, Sutiyoso dan T Soendoro,** 2003. Bovine Zona Pellucida Deglycosylated (bZP3dG) and The Prospect for Imunocontraceptive Vaccine. Media Kedokteran Hewan 19(3) : 117–120.
- Aulani²am,** 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.
- Austyn JN and Wood KJ,** 1994. Principle of cellular and molecular immunology. Oxford : Oxford University Press, Pp 39–46.
- Barber MR and A Fayrer-Hosken,** 2000. Possible mechanism of mammalian immunocontraception. J Immun Reprod. 46(2000) 03–124.
- Bongso A and Gardner DK,** 2000. Embryo development. In: Trounson AO and Gardner DK (Eds). Handbook of In Vitro Fertilization. 2nd Ed CRC Press, Washington DC. Pp: 167–179.
- 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.
- Dunbar BS, CL Lo, J Powell and VC Stevens,** 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.
- Goldsby RA, TJ Kindt and BA Osborne,** 2000. Kuby immunology. 4th Ed. New York: W.H. Freeman and company, Pp 10–15.
- Gordon I,** 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. Cambridge University Press, Cambridge. Pp: 231–233.
- Hasegawa A, Y Hamada, M Shigeta, and K Koyama,** 2002. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA). J. Reprod. Immunol. 53: 91–98.
- Henderson CJ, MJ Hulme and RJ Aitken,** 1987a. Analysis of the biological properties of antibodies raised against intact and deglycosylated porcine zona pellucidae. Gamete Res 16: 323–34.
- Henderson CJ, P. Braude and RJ. Aitken,** 1987b. Polyclonal antibodies to a 32-kDa deglycosylated polypeptide from porcine zona 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.
- Mahaputra L, Hinting A, Mustofa I, and 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,** 2000. Pemanfaatan teknologi bayi tabung untuk mengembangkan bank embrio sapi Madura. Media Kedokteran Hewan. 16(3): 17–20.
- Mahaputra L and 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.
- McCartney CA and KE Mate,** 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 GJ. Broze,** 1990. Protein is not glycosylated at asparagine 329. J. Biol. Chem. 329: 11397–11404.
- Mustofa I, Mahapura L, Rantam FA dan 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, S. Mulyati and L. Mahaputra,** 2004b. Pengaruh Imunisasi dengan Zona Pelusida- 3 Kambing terhadap Angka Kebuntingan dan Jumlah Anak pada Mencit (*Mus musculus*). Media Kedokteran Hewan 20(1): 22–25.
- Naz RK and Zhu X,** 1998. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. Biol Reprod 59: 1095–1100.
- Paterson M, PT Koothan, KT Morris, KT O’Byrne, P Braude, A Williams, RJ Aitken,** 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, MR Wilson, ZA Jennings, M van Duin and RJ Aitken**, 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol Hum Reprod* 5(4): 342–52.
- Paterson M, MR Wilson, ZA Jennings, and RJ Aitken**, 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, and Schatten G**, 2000. SNAREs in mammalian sperm: possible implications for fertilization. *Developmental Biology* 223: 54–69.
- Rankin T and J Dean**, 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5: 114–121.
- 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.
- 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.
- Skinner SM, ES Schwoebel, SV Prasad, M. Oguna and BS Dunbar**, 1999. Mapping of dominant B-cell epitopes of a human zona pellucida protein (ZP1). *Biol Reprod*. 61(6): 1373–80.
- Smith JB and Mangkoewidjojo S**, 1988. Pemeliharaan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. Surabaya: Penerbit Universitas Airlangga, Hal 1–15.
- 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.
- Thaler CD. and RA. Cardullo**, 1996. Distinct Membrane Fractions from Mouse Sperm Bind Different Zona Pellucida Glycoproteins. *Biology of Reproduction* 66: 65–69.