

## Analisis Titer Antibodi Bovine Zona Pellusida 3 (Anti-bZP3) Hasil Induksi Bovine Zona Pellusida 3 (bZP3) pada Kera (*Macaca fascicularis*)

Maris Kurniawati<sup>1</sup>, Sutiman B. Sumitro<sup>2</sup>, Aulanni'am<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang

<sup>2</sup>Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

### Abstrak

Zona pellusida 3 merupakan molekul glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor primer spermatozoa dalam proses fertilisasi. Bovine zona pellusida 3 (bZP3) dapat dikembangkan sebagai target antigen untuk vaksin imunokontrasepsi. Efektivitas kerja antibodi sangat dipengaruhi oleh titer antibodi. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah mengetahui profil titer antibodi bovine zona pellusida 3 (anti-bZP3) hasil induksi bovine zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*). Imunisasi bZP3 pada kera (*Macaca fascicularis*) dilakukan secara sub kutan (SC) menggunakan CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) untuk imunisasi pertama dan IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) untuk imunisasi booster 1 dan booster 2. Serum dipanen sebanyak 4 kali setelah booster 1 dan 2. Hasil analisa menunjukkan berat molekul anti-bZP3 dari kera adalah 160 kDa. Titer naik mulai minggu ketiga hingga kelima dan turun lagi setelah minggu keenam setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga keempat pasca booster pertama) dan titer naik kembali pada minggu ke tujuh hingga kesembilan serta turun pada minggu ke sepuluh setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga ke empat pasca booster kedua). Titer antibodi tertinggi dicapai pada minggu kesembilan pasca imunisasi pertama atau minggu ketiga pasca booster kedua.

**Kata kunci:** bZP3, imunokontrasepsi, *Macaca fascicularis*, zona pellusida

### Abstract

Pellucida Zone 3 is a glycoprotein molecule that functioned as the primary receptor of spermatozoa in the fertilization process. Bovine zona pellucida 3 (bZP3) can be developed as an antigen target for vaccine immunocontraception. Effectiveness of the antibody strongly influenced by the antibody titer. The purpose of this study was to determine the profile of bovine anti-bZP3 titers from the induction of bZP3 in monkeys (*Macaca fascicularis*). Immunization of bZP3 in monkeys conducted via sub-cutaneous (SC) using CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) for the first immunization and IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) for immunization booster 1 and booster 2. Serum harvested 4 times after the booster 1 and 2. The analysis shows the molecular weight of monkey's anti-bZP3 is 160 kDa. Titer rise began at the third until the fifth week and decrease again after the sixth week after the first immunization (first to fourth week after the first booster) and titers rose back in seventh to ninth week and decrease in tenth weeks after the first immunization (first to four week after the second booster). The highest antibody titers achieved in the ninth week after the first immunization or three weeks after the second booster.

**Keywords:** bZP3, immunocontraception, *Macaca fascicularis*, zona pellucida

### PENDAHULUAN

Fertilisasi merupakan proses biologi dasar yang melibatkan interaksi sel-sel sperma dan sel-sel telur. Metode kontrasepsi dapat dilakukan dengan cara mencegah fertilisasi. Fertilisasi pada mamalia melibatkan bagian oosit yang disebut zona pellusida (ZP) yaitu suatu matrik ekstrasvaskuler yang menyelubungi oosit dan mempunyai fungsi penting dalam proses fertilisasi dan tahap awal perkembangan embrionik [1].

Rekayasa penghambatan fertilisasi dapat dilakukan dengan cara mengganggu fungsi reseptor sperma yang ada pada permukaan zona pellusida. ZP dari spesies yang heterolog menimbulkan reaksi imun yang kuat dan antibodi zona pellusida (anti-ZP) dapat menghambat fertilisasi [2]. Hal ini merupakan dasar pendekatan imunologi untuk menghasilkan vaksin kontrasepsi yang aman, ekonomis dan reversibel [3]. Hanya ada dua jenis glikoprotein yang berperan dalam proses fertilisasi yaitu ZP2 dan ZP3. ZP3 selain berperan serta sebagai reseptor primer spermatozoa juga dapat menginduksi reaksi akrosom, sedangkan ZP2 berperan sebagai reseptor sekunder untuk menjaga terikatnya sperma [4].

\* Alamat korespondensi:

Aulanni'am

Email : aulanibiochem@yahoo.com

Alamat : Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya  
Malang

Menurut Bagavant *et al.* [5] hasil studi menggunakan ZP sebagai imunogen ternyata menimbulkan antibodi dan dapat mencegah fertilisasi secara *in vivo*, tetapi diikuti oleh kerusakan ovarium mulai dari primordial folikel sampai folikel yang telah berkembang. Namun hal ini dapat diminimalisasi dengan pemberian imunisasi ZP3 murni. Penelitian yang dilakukan Sumitro dan Aulanni'am [6] telah menetapkan bahwa *bovine* ZP3 (bZP3) sebagai antigen spesifik yang diisolasi dari oosit sapi dapat menghambat fertilisasi yang bersifat reversibel dan efektif dalam merangsang terbentuknya antibodi bZP3 (anti-bZP3). Titer antibodi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi antigen serta spesies hewan.

Bagavant *et al.* [5] melaporkan bahwa antigen zona pellusida efektif digunakan untuk imunokontrasepsi dalam berbagai jenis hewan. *Bovine* zona pellusida digunakan sebagai antigen karena antibodi yang dihasilkan mempunyai kemampuan yang cukup besar bereaksi silang dengan zona pellusida spesies mamalia seperti tikus dan kelinci. Efek anti fertilitas dari imunisasi aktif dengan antigen bZP3 telah ditunjukkan pada beberapa model hewan. Dalam penelitian ini akan dilakukan induksi bZP3 berbasis vaksin imunokontrasepsi pada hewan coba dari spesies anggota ordo primata yaitu kelompok kera (*Macaca fascicularis*) yang diperkirakan lebih mendekati manusia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil titer antibodi *bovine* zona pellusida 3 (anti-bZP3) hasil induksi *bovine* zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*).

## METODOLOGI

### Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler dan Laboratorium Biokimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, serta Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

### Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang dipakai dalam penelitian ini meliputi NaCl fisiologis 0,9%, *streptomycin*, *pinicilin*, *phosphate buffer saline* (PBS), *phenil metil sulfonil fluoride* (PMSF), *buffer tris-Cl*, SAS 50%, *buffer fosfat*, PBS-*tween* 20, *blocking buffer*, *buffer karbonat-bikarbonat*, *tris buffer saline* (TBS) dan NaOH 3 M.

Alat-alat penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah *disposable syringe*, tabung reaksi, pipet pasteur, cawang petri, mikroskop

stereo, *ependorf*, sentrifus, *freezer*, elektroforesis, bunsen, gelas beker, *water bath*, *vortex*, pH meter, selofan, stirer, mikropipet, seker.

### Koleksi Ovarium

Ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis (0,9%), kemudian dimasukkan botol yang telah berisi NaCl fisiologis yang sudah ditambah pinisilin 0,006 gram/100 mL dan *streptomycin* 0,001 gram/100 mL dan sudah dihangatkan dengan suhu  $\pm 38^{\circ}\text{C}$ . Botol berisi ovarium dimasukkan kedalam termos pendingin kemudian dibawa ke laboratorium paling lambat 5 jam setelah pemotongan. Ovarium dibersihkan dari jaringan lemak dan jaringan ikat kemudian disimpan dalam freezer ( $-10^{\circ}$ ) maksimum 3 hari.

### Isolasi Oosit

Oosit didapatkan dengan metode aspirasi. Oosit sapi direndam dalam NaCl fisiologis (0,9%), ovarium diambil dengan pinset. Ovarium diaspirasi dengan menggunakan *disposibel syringe* 5 mL dengan ukuran jarum 226x1/2" yang telah diisi dengan PBS dingin 2-4°C steril kurang lebih 1 mL. Hasil aspirasi berupa cairan folikel yang sudah dicampur dengan PBS dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril, kemudian didiamkan selama kurang lebih 20 menit untuk diendapkan. Dua pertiga larutan folikel bagian atas dibuang dengan menggunakan pipet pasteur. Sisanya dicuci dengan PBS dingin steril, caranya dengan menyemprotkan PBS dengan kuat ke dasar tabung selanjutnya diendapkan  $\pm 20$  menit, perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali.

Cairan folikel yang sudah dicuci tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri steril berdiameter 10 cm. Cairan folikel diamati dibawah mikroskop stereo, oosit dipilih yang gundul (kualitas KO) dan dipindahkan dalam cawan petri steril berisi PBS. Oosit dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dengan cara memindahkan oosit dengan pipet pasteur ke dalam cawang petri steril yang telah berisi PBS.

### Isolasi Bovine Zona Pellusida

Oosit yang sudah dikumpulkan dipecah dengan cara disedot dan ditiup menggunakan pipet pasteur yang berdiameter 8  $\mu\text{m}$  di dalam larutan PBS yang telah ditambah 0,05 mM PMSF. Setelah itu bZP dicuci dengan PBS dingin (2-4°C) steril, dengan cara memindahkan bZP ke dalam cawan petri steril yang sudah berisi PBS. Selanjutnya bZP dipindah ke dalam larutan PBS. bZP dimasukkan kedalam *ependorf* yang berisi

PBS dengan pipet pasteur sambil dihitung jumlahnya, kemudian disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm 4°C selama 30 menit. Supernatan dibuang, dikeringkan kemudian ditambah 20 mM Tris-Cl 20 µl. bZP disimpan dalam freezer suhu -10°C dan siap digunakan sebagai bahan isolat bZP3.

### Isolasi Zona Pellusida 3

Bahan isolat bZP ditambah RSB (1:1) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan sumuran gel yang sebelumnya telah disiapkan. Running dilakukan pada tegangan 200 V dan arus 40 mA dengan konstan arus. Gel hasil elektroforesis kemudian dipotong pada daerah 77 kDa dan dilanjutkan dengan elektroelusi.

Gel yang telah dipotong dimasukkan dalam selofan yang telah berisi *buffer fosfat* 0,05 M sebanyak 1 mL. Elektroelusi dilakukan pada suhu 4°C semalam dengan tegangan 250 V dan arus 20 mA konstan arus. Setelah dielektroelusi semalam *buffer fosfat* diambil dan dimasukkan ependorf. Etanol dingin dimasukkan dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Selanjutnya, homogenat disentrifuge dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. Etanol dibuang dan didapatkan presipitat bZP3. Presipitat dilarutkan pada *buffer tris-Cl* 20mM sebanyak 600 mikroliter. Sampel bZP3 disimpan pada freezer suhu -10°C dan siap digunakan untuk imunisasi.

### Imunisasi dengan bZP3

Imunisasi pertama dilakukan pada kelompok hewan coba dengan menambah 300 µl bZP3 ke dalam *Complete Freund's Adjuvant*. Injeksi dilakukan dibagian subkutan pada beberapa sisi. Imunisasi kedua dilakukan dengan menambah 300 µL bZP3 ke dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* yang disebut *booster* I. Kemudian dilakukan pengambilan darah dan *booster* II. Kemudian dilakukan pengambilan darah lagi.

### Isolasi Serum dari Hewan Coba

Darah yang telah didapat sesuai masa inkubasinya didiamkan selama 10 menit pada suhu ruang darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 20 menit. Supernatan sebagai serum dipindahkan ke dalam *ependorf* dan disimpan pada suhu -2°C untuk selanjutnya dilakukan purifikasi.

### Purifikasi Anti bZP3 dari Serum

Serum ditambah dengan SAS 50% dengan pertandingan 1:1 kemudian dihomogenkan

dengan *vortex*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4°C selama beberapa menit. Supernatan dibuang, presipitat ditambah dengan SAS 50% (10 kali volume pelet), kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M *buffer fosfat* pH 7 dan didialisis semalam pada suhu 4°C.

### Pengukuran Titer Anti-bZP3

Anti-bZP3 yang dihasilkan dikarakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay*) dengan metode indirect ELISA.

Antigen ZP3 dengan kadar 1 µg/ml dilarutkan dalam *carbonat bicarbonate (coating buffer)* dimasukkan dalam mikroplate sebanyak 50 µl tiap *well*. Selanjutnya diinkubasi pada 4°C selama semalam kemudian mikroplate dicuci dengan PBS/*tween* 20 empat kali. Anti-bZP3 (antibodi primer) dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengeceran 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 kemudian dimasukkan mikroplate masing-masing 50 µl tiap *well*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Mikroplate dicuci lagi dengan PBS/*tween* 20 empat kali. Selanjutnya anti-human IgG berlabel alkaline fosfatase dilarutkan dalam PBS/*tween* 20 dengan pengeceran 1/1000 dimasukkan mikroplate sebanyak 50 µl tiap *well*, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 1 jam. Mikroplate dicuci dengan PBS/*tween* 20 sebanyak empat kali kemudian substrat pNPP dalam etanolamin 10% dimasukkan dalam mikroplate masing-masing sebanyak 50 µl tiap *well*. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang 30 menit dalam ruang gelap, ditambah dengan NaOH 3M sebanyak 50 µl/*well*. Titer diukur dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.

### Analisa Antibodi Zona Pellusida

#### Elektroforesis SDS-PAGE

Antibodi zona pellusida ditambah dengan RSB (1:1) kemudian dipanaskan pada suhu 100°C selama 3 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan sumuran gel yang sebelumnya telah disiapkan. Running dilakukan pada tegangan 150 V dan arus 30 mA dengan konstan arus. Selanjutnya gel dikeluarkan dan dilakukan pewarnaan hingga terlihat band-band yang berwarna ungu.

#### Dot Blotting

Antigen diencerkan dalam PBS natrium azida 1% (1:4). Antigen yang telah diencerkan,

diteteskan pada membran nitroselulose yang telah dibasahi dengan PBS (terangkai pada alat dot blotter) dan di degas selama 30 menit.

Membran yang telah mengikat antigen diblok dengan PBS skim milk 5% selama 1 jam sambil digoyang. PBS skim milk dibuang kemudian dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali. Kemudian diinkubasi dalam serum (antibodi primer) yang telah diencerkan dengan PBS skim milk 1% selama 2 jam sambil digoyang.

Membran + antigen + antibodi primer dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali. Kemudian di inkubasi dalam anti-human IgG *Alkaline Phosphatase (AP) Conjugated* yang telah diencerkan dalam PBS selama 1 jam sambil digoyang. Kemudian membran dicuci dengan PBS/tween 20 sebanyak 3 kali, dan di inkubasi dalam *Subtract Western Blue* selama 3 menit dalam ruang gelap. Reaksi dihentikan dengan menambah akuades dan membran dikeringkan. Pada membran akan tampak noda berwarna ungu.

### Western Blotting

*Western blotting* merupakan kelanjutan dari elektroforesis. Gel hasil elektroforesis dicuci dengan akuades kemudian direndam pada *blotting buffer*. Kertas saring juga direndam dalam *blotting buffer*. Selanjutnya disusun *sandwich* dengan urutan: kertas saring–membran PVDF, gel hasil elektroforesis–kertas saring dan dilakukan transfer dengan tegangan konstan 15 V dan arus kurang dari 0,35 A semalam. Membran diblok dengan 5% nonfat *milk* pada PBST selama 1 jam dan diseker. Kemudian dicuci dengan PBST 3x5 menit. Inkubasi antibodi primer semalam. Selanjutnya dicuci dengan TBS 3x5 menit. Inkubasi antibodi sekunder selama 1 jam pada temperatur ruang. Setelah itu dicuci dengan PBST 3x5 menit. Ditambahkan substrat untuk *blotting* pada ruang gelap dengan temperatur ruang dan dibiarkan semalam hingga terlihat warna band.

### Spektrofotometri UV-Vis

Masing-masing serum antibodi yang telah dipurifikasi dilarutkan dalam *buffer phosphat* 0,05 M kemudian dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 270 nm. Selanjutnya profil spektra dari setiap serum dianalisis.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

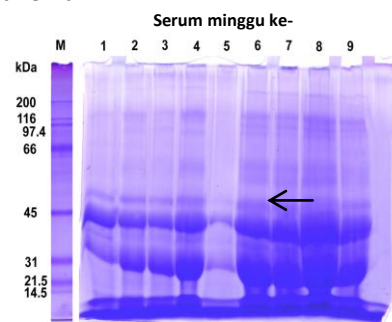
### Imunisasi Bovine Zona Pellusida 3 Pada Kera

Anti-bZP3 diperoleh dengan cara imunisasi bZP3 pada kelompok kera. Imunisasi dilakukan dengan penambahan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) pada 300 µl ZP3 dengan perbandingan 1:1 dilanjutkan dengan *booster 1* dan *booster 2* menggunakan 300 µl ZP3 dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1. Kadar protein yang digunakan imunisasi sebesar 728 µg/ 200 µl pelarutnya. Persyaratan yang harus dimiliki oleh antigen adalah melebihi kadar protein 300 µg/ 200 µl pelarutnya. bZP3 yang telah diinduksikan dalam kera telah memenuhi syarat sebagai antigen. Bagavant *et al.* [5] telah melakukan imunisasi pada kera dari spesies *Macaca radiata* dengan menggunakan *porcine* zona pellusida 3 sebanyak 100 µg pZP3 dan mampu menginduksi sintesis anti-pZP3.

### Penentuan Berat Molekul Antibodi bZP3

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menggunakan metode *Sodium Dodesil Sulfat-Poliakrilamid Gel Elektroforesis (SDS-PAGE)*.

Hasil elektroforesis serum kera menunjukkan bahwa ada pola pita yang berbeda antara serum kontrol dan serum kera perlakuan. Perbedaan tersebut dapat dilihat dari pita pada 158,6-162,4 kDa yang tidak terdapat pada kontrol. Rata-rata berat molekul dari anti-bZP3 dari serum kera adalah 160 kDa. Pita dengan berat molekul tersebut diduga sebagai IgG karena IgG merupakan imunoglobulin yang dominan pada serum darah. Pengambilan darah hingga dalam kurun waktu yang lama (3-10 minggu) hanya mungkin dari Ig G. Ig A berumur 6 hari, Ig D berumur 3 hari, Ig E berumur 2 hari dan Ig M berumur 5 hari.



**Gambar 1.** Elektroforegram dari serum kera pasca imunisasi 1. Keterangan: ← : anti-bZP3.

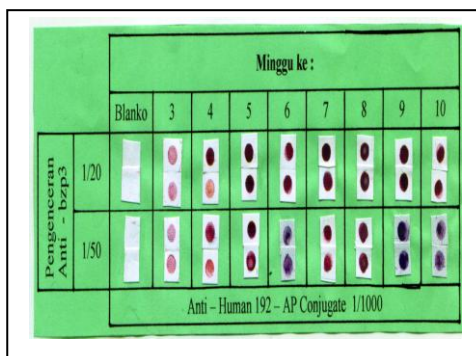
Pita hasil elektroforesis mempunyai ketebalan yang berbeda. Hal itu menunjukkan adanya

perbedaan konsentrasi anti-bZP3. Pita paling tebal terdapat pada minggu ke lima (minggu ke 3 setelah booster 1) dan minggu ke 9 (minggu ke 3 setelah booster 2) setelah imunisasi pertama. Pita yang ditunjukkan setelah booster kedua relatif lebih tebal dibanding setelah booster pertama. Hal ini disebabkan respon imun setelah booster kedua lebih tinggi dari pada setelah booster pertama.

### Uji Spesifisitas Antibodi bZP3 dengan bZP3

Untuk mengetahui spesifisitas antibodi (imunoglobulin) sebagai respon dari imunisasi bZP3 dilakukan dengan menggunakan metode *dot blotting* dan *western blotting* yang bersifat semi kuantitatif. Hasil *dot blotting* memperlihatkan adanya reaksi antigen bZP3 dengan antibodi terhadap bZP3.

Pada kontrol tidak menunjukkan adanya reaksi antigen dengan antibodi. Hal ini berarti kera yang telah diimunisasi dengan bZP3 memberikan respon dengan menghasilkan antibodi terhadap bZP3 dan sifat spesifitas anti-bZP3 terhadap bZP3.



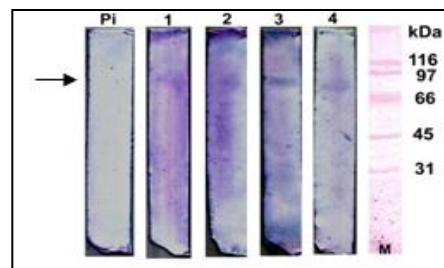
**Gambar 2.** Uji keberadaan dan spesifitas bZP3 terhadap anti-bZP3 menggunakan metode *dot blotting*.

Warna ungu dari hasil pengujian menunjukkan bahwa antigen bZP3 dapat dikenali oleh anti-bZP3. Warna itu menunjukkan telah terjadi reaksi spesifik antara bZP3 dengan anti-bZP3 yang difasilitasi dengan penambahan antibodi sekunder yang terlabel oleh *alkaline phosphatase* (AP) dengan substrat *western blue*. Pada kontrol tidak menimbulkan warna ungu karena dalam serum hewan kontrol tidak terdapat anti-bZP3.

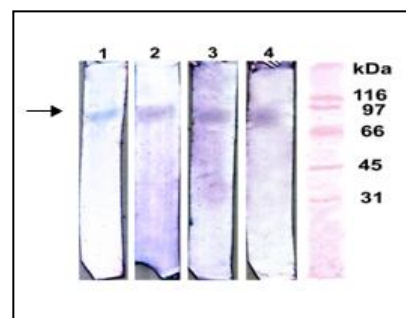
Pengenceran anti-bZP3 sampai 1/50 masih menunjukkan intensitas yang berbeda pada pemanenan serum yang berbeda. Intensitas warna ungu tertinggi terdapat pada minggu ke lima setelah imunisasi pertama dan minggu ke sembilan setelah imunisasi pertama. Minggu ke lima berarti minggu ke tiga setelah booster pertama dan minggu kesembilan berarti minggu

ketiga setelah booster kedua. Selanjutnya pada minggu ketiga setelah imunisasi pertama atau minggu pertama setelah booster pertama warna ungu yang dihasilkan lebih tipis dibandingkan pada minggu keempat dan kelima.

Uji *western blotting* dipakai untuk melakukan konfirmasi terhadap data *dot blotting* seperti Gambar 3 dan 4. Intensitas warna ungu hasil *western blotting* pada Gambar 3 hasil pewarnaan anti-bZP3 minggu ketiga hingga kelima pasca imunisasi pertama terjadi peningkatan intensitas warna ungu tetapi melemah pada minggu ke enam pasca imunisasi pertama. Hal ini juga terjadi pada pewarnaan anti-bZP3 pada minggu 7, 8, 9 pasca imunisasi pertama. Intensitas warna ungu bertambah dari minggu ke 7 hingga ke 9 dan mulai melemah pada minggu 10, sehingga data profil titer antibodi secara kualitatif dapat diketahui. Hasil *western blotting* menunjukkan perbedaan intensitas warna sebanding dengan konsentrasi anti-bZP3 dimana peningkatan konsentrasi titer terjadi ketika intensitas warna bertambah karena peningkatan intensitas warna menunjukkan kompleks antigen-antibodi yang terbentuk semakin banyak.



**Gambar 3.** Uji keberadaan dan Spesifitas bZP3 dari serum kera (*Western Blotting*) setelah imunisasi pertama.



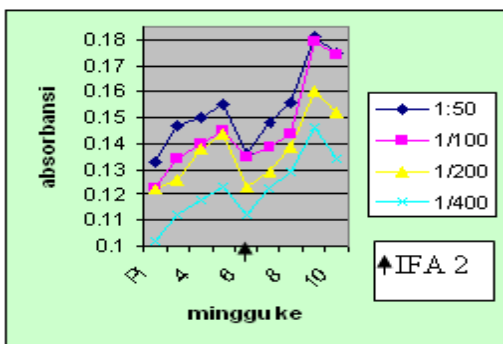
**Gambar 4.** Uji Keberadaan dan Spesifitas bZP3 terhadap anti -bZP3 dari serum kera menggunakan metode *western blotting* setelah imunisasi pertama.

Keterangan: (M) marker; (1) minggu 7; (2) minggu 8; (3) minggu 9; (4) minggu 10; → : Posisi bZP3 yang dikenali anti-bZP3 dari kera.

Kemampuan bZP3 dalam menginduksi anti-bZP3 pada *Macaca fascicularis* dapat diartikan bahwa apabila dibentuk pada *macaca* betina dapat menghambat proses fertilisasi.

### Analisa Kuantitatif Anti-bZP3 dari Serum Kera dengan Metode ELISA

Titer anti-bZP3 pada langkah kerja ini diukur berdasarkan nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm pada ELISA reader dengan metode *Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay* (ELISA).



Gambar 5. Analisa Profil Titer anti-bZP3 dari Serum kera hasil Induksi bZP3 menggunakan Metode ELISA. Keterangan: Pi: preimun; IFA2: booster kedua bZP3.

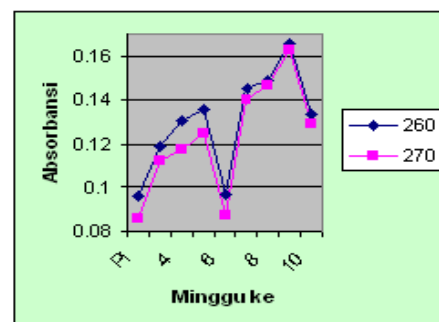
Gambar 5 menunjukkan bahwa profil titer anti-bZP3 yang diperoleh dari serum kera yang diinduksi oleh bZP3 meningkat dari minggu ketiga hingga minggu kelima dan menurun pada minggu keenam pasca imunisasi pertama. Titer tertinggi terjadi pada minggu kelima. Hasil pengukuran titer anti-bZP3 yang dipanen pada minggu-minggu pasca booster kedua menunjukkan titer yang lebih tinggi.

Induksi bZP3 akan memberikan respon dengan dihasilkannya anti-bZP3. Tiga ratus mikroliter bZP3 yang diinduksikan ternyata mampu menginduksi anti-bZP3 yang terus meningkat dari minggu ke 3 hingga ke 5 pasca imunisasi pertama, artinya selama tiga minggu bZP3 mampu menginduksi terbentuknya anti-bZP3. Setelah minggu ke 6 titer mengalami penurunan. *Booster* imunisasi antigen perlu diberikan pada saat titer antibodi yang ditimbulkan sudah rendah. Apabila *booster* diberikan pada saat titer tinggi maka pemberian *boster* tidak dapat menginduksi terbentuknya antibodi karena antigen yang masuk akan ditangkap oleh antibodi yang ada. *Booster* diberikan pada saat titer rendah untuk menginduksi terbentuknya antibodi kembali dan tidak ditangkap oleh antibodi yang diinduksi pada imunisasi sebelumnya. Minggu ke 3 merupakan

perhitungan dari pemberian imunisasi pertama. Sedangkan dari pemberian *booster* berselang seminggu. Hal ini dapat diartikan bahwa pemberian *booster* kembali diperlukan setelah 4 minggu dari *booster* sebelumnya. Minggu ke 7 hingga minggu 9 titer mengalami peningkatan dan menurun setelah minggu ke 10. Profil ini sama dengan profil minggu-minggu sebelumnya, dimana puncak tertinggi pada minggu 9 atau minggu ke 3 setelah *booster* ke 2.

Hasil pengukuran absorbansi ELISA dengan pengenceran anti-bZP3 1/50, 1/100, 1/200 dan 1/400 menunjukkan pola profil titer dari anti-bZP3 dari serum kera sebanding dengan besarnya pengenceran. Pengukuran titer dengan pengenceran sampai dengan 1/400 masih dapat dibaca profil titernya. Berbagai pengenceran yang telah dilakukan dimaksudkan untuk mengetahui tingkat sensitifitas dari pengukuran titer anti-bZP3 dengan menggunakan metode ELISA. Sensitifitas tertinggi adalah pengukuran antibodi dengan pengenceran tertinggi.

Hasil ELISA didukung dengan data hasil pengukuran absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260 nm dan 270 nm. IgG dapat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 260-270 nm sehingga pada penelitian ini pengukuran dengan metode spektrofotometri merupakan data pendukung dari data yang diperoleh dari metode ELISA. Profil titer hasil pengukuran dengan metode spektrofotometri dapat dilihat pada gambar 6. Hal ini sesuai dengan pendapat [7] yang menyatakan bahwa protein yang mempunyai gugus karboksilat dan gugus amina mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 260 nm.



Gambar 6. Penentuan absorbansi anti-bZP3 dari serum kera dengan spektrofotometer UV-Vis dengan  $\lambda$  260 nm dan 270 nm. Keterangan: Pi: preimun.

Hasil pengukuran anti-bZP3 dengan metode ELISA mempunyai kesamaan dengan hasil pembacaan dengan spektrofotometri. Titer

tertinggi terdapat pada minggu kelima setelah imunisasi pertama dan minggu ke sembilan setelah imunisasi kedua. Namun puncak tertinggi titer anti-bZP3 terjadi pada minggu kesembilan pasca imunisasi pertama.

Adapun induksi anti-bZP3 diduga melalui jalur yaitu antigen ditangkap oleh APC (sel dendrit), dan dipresentasikan bersama MHC kelas II yang mengadakan kompleks dengan dendrite sel. Sinyal dibawa oleh T helper menyebabkan aktivasi T helper untuk membentuk reseptor T, selanjutnya disekresikan soluble molekul sitokin (IL – 2) yang mengaktifasi sel-sel yang lain seperti aktivasi pada sel B. Dalam plasma limfosit B mensekresikan Ig G sebagai anti-bZP3 dan pada mamalia betina anti-bZP3 akan menuju pada target sel yaitu sel ovarium [6].

Molekul ZP3 dari satu spesies dengan spesies yang lain terdapat bagian yang bersifat homolog. Menurut Carino *et al.* [8] ZP3 babi mempunyai homologi dengan manusia sebesar 74 %. Homologi ini juga terjadi pada mamalia yang lain. Antara sapi dengan kera juga ada sifat homologi tersebut maka pada saat dilakukan imunisasi pada kera maka antibodi yang dihasilkan akan mengenali bZP3 pada kera. Selanjutnya akan terjadi interaksi dari ZP3 hewan yang diinduksi dengan anti-bZP3 hasil induksi bZP3.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa induksi *bovine* zona pellusida 3 (bZP3) pada kera (*Macaca fascicularis*) mampu mensintesis anti *bovine* zona pellusida 3 (anti-bZP3). Karakteristik anti-bZP3 hasil induksi bZP3 pada kera mempunyai berat molekul sebesar 160 kDa. Data *imunoblotting* menunjukkan bahwa profil titer antibodi bZP3 menunjukkan peningkatan dari minggu 3 hingga minggu ke 5 setelah imunisasi pertama dan menurun setelah minggu ke 6 (minggu pertama hingga ke 4 setelah *booster* 1). Titer kembali meningkat setelah *booster* 2 dan mencapai puncak pada minggu ke 9 dan turun kembali pada minggu ke 10 setelah imunisasi pertama (minggu pertama hingga ke 4 setelah *booster* 2). Titer pada minggu ke 5 rata-rata sebesar 0,15 dan pada minggu ke 9 rata-rata sebesar 0,17 dengan metode ELISA pada pengeceran anti-bZP3 1/100.

### Saran

Masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang peranan bZP3 sebagai calon imuno-

kontrasepsi pada kelompok kera (*Macaca fascicularis*).

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Sinowatz F. 2002. Kumpulan Abstrak PIN 2002 PAAI: New Concepts in Sperm-Oocyte, Interaction and Immunocontraception. University of Munich. Germany.
- [2] Hasegawa A., Yamakasi N., Inove M., Koyama K., dan Isojika S. 1995. Analysis of an epitope sequence recognized by monoclonal antibody Mab-5H4 against a Porcine Zona Pellucida Glycoprotein (p-ZP4) that block fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*. 105 (2): 295-302.
- [3] Gwatkin R.B.L. 1982. Receptor for sperm on the mammalian ovum. In Hafez E.S.E. and Semm K. (Eds). In Vitro fertilization and embryo transfer. A.R. Liss. New York.
- [4] Bauksin A.R., Franken D.R., Eberspacher U., dan Domes P. 1999. Characterization of Human Zona Pellucida Glycoprotein. *Molecular Human Reproduction*. 5 (6): 534-540.
- [5] Bagavant H., Thillai-Koothan P., Sharma M.G., Talwar G.P., dan Gupta S.K. 1994. Antifertility effect of Porcine Zona Pellucida-3 immunization using permissible adjuvant in female Bonnet Monkey (*Macaca radiata*): Reversible, effect on follicular development and hormonal profiles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102: 17-25.
- [6] Sumitro S.B. dan Aulanni'am. 2002. Zona Pellucida 3 (ZP3) has proper biochemical properties to be considered as candidate antigen for immunocontraceptive vaccine. *Reprotech*. 1 (1). 51-53.
- [7] Hendayana S.A., Kadarohmah, Sumarna A.A., dan Supriatna A. 1994. Kimia Analitik Instrumen. IKIP Semarang Press. Semarang.
- [8] Carino C.L.D. and Mendez I. 2001. Zona pellucida antigens in the human ovum: its importance in contraceptive strategies. *Revista de Investigacion Clinica*. 53 (2): 174-180.