

CATATAN PENELITIAN

Uji Reversibilitas Imunokontrasepsi Zona Pelusida-3 Kambing (gZP3) pada Mencit (*Mus musculus*)

Immuncontraception Reversibility Test of Goat Zona Pellucida-3 (gZP3) on Mice (Mus musculus)

IMAM MUSTOFA

*Bagian Reproduksi Veteriner, FKH, Universitas Airlangga, Kampus C Unair, Jalan Mulyorejo, Surabaya 60115
Tel. +62-31-5992377, Fax. +62-31-5993015, E-mail: mustof@unair.ac.id*

Diterima 13 Februari 2006/Disetujui 29 November 2006

The aim of this study was to prove the reversibility of gZP3 protein on mice as an animal model. Treatment group of mice (*Mus musculus*) were immunized with 40 µg goat zona pellucida-3 (gZP3) as an anti fertility agent. Control group of mice were injected only with physiologic solution. The mice were injected three times, the first injection as an immunization. The second and third injected as a booster with 14 days interval. The first injection, gZP3 suspension was diluted in complete Freund's adjuvant (CFA). The boosters, gZP3 suspension was diluted in incomplete Freund's adjuvant (IFA) 1:1 (v/v). Blood samples were collected before immunization, seven days after the second booster and at the time of parturition. Seven days after the last injection, the mice were mated, and the parturition was observed after that. The result showed that antibody titer of immunized mice serum was increasing ($P < 0.05$) seven days after immunization, and decreasing ($P > 0.05$) after parturition compared to antibody titer of serum before immunization. Dot blotting analysis showed that gZP3 protein could recognize gZP3 antibody of the immunized mice. Protein of gZP3 as an immuncontraceptive substance was reversible in 91.60 ± 4.90 days. This reversibility was longer ($P < 0.05$) compared to control mice i.e. 26.50 ± 4.30 days.

Key words: immuncontraception, goat zona pellucida-3, reversibility, mice, animal model, gZP3 antibody

Penelitian tentang imunokontrasepsi ditujukan untuk menemukan bahan yang dapat menambah ragam pilihan cara kontrasepsi 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. Hal ini disebabkan protein ZP3 adalah reseptor primer pengenalan spermatozoa untuk terjadinya fertilisasi (Sumitro & Aulanni'am 2001). Syarat sediaan imunokontraseptif yang baik adalah memiliki sifat reversibel, efisiensi tinggi, tidak menimbulkan efek samping, aplikasinya mudah, jumlah pemberiannya sedikit, aktivitas panjang sekurang-kurangnya satu tahun, dan harga terjangkau (Barber & Fayerer-Hosken 2000).

Zona pelusida yang telah diteliti potensi imunokontraseptifnya adalah ZP3 babi (*porcine zona pellucida-3*, pZP3) dan ZP3 sapi (*bovine zona pellucida-3*, bZP3) (Sumitro & Aulanni'am 2001). Beberapa zona pelusida spesies lain yang telah diteliti adalah zona pelusida mencit (*M. musculus*), manusia (*Homo sapiens*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), tikus (*Rattus norvegicus*), dan *Macaca radiata* (Rankin & Dean 2000). Protein zona pelusida diimunisasikan pada hewan percobaan dalam bentuk ZP3 *native* (Paterson *et al.* 1999), ZP3 rekombinan (Paterson *et al.* 2002), maupun ZP3 terdeglikosilasi (Aulanni'am *et al.* 2003). Namun, sampai saat ini belum ada hasil akhir penelitian yang siap diimplementasikan karena berbagai faktor dan efek sampingnya. Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi reseptor fertilisasi (ZP3) pada berbagai spesies untuk mendapatkan bahan imunokontrasepsi yang ideal.

Mustofa *et al.* (2004b) membuktikan bahwa imunisasi hewan percobaan dengan 40 µg gZP3 dalam larutan *Freund's adjuvant* dapat mencegah kebuntingan pada seluruh hewan coba mencit. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa gZP3 tidak menyebabkan kelainan gambaran histologis ovarium (Mustofa 2005a) dan tidak menimbulkan kelainan siklus birahi maupun profil hormon progesteron (Mulyati *et al.* 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penundaan melahirkan pada mencit setelah imunisasi dengan protein gZP3.

Isolasi Protein gZP3. Identifikasi dan isolasi protein gZP3 dilakukan pada penelitian sebelumnya (Mustofa *et al.* 2004a). Ovarium kambing diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) Pegirian, Surabaya. Folikel-folikel pada ovarium diaspirasi menggunakan *disposable syringe* 10 ml yang berisi *phosphate buffer saline* (PBS, SIGMA P5119). Oosit dilepaskan dari sel-sel kumulus dengan cara dipipet dan dicuci tiga kali dengan PBS tanpa menggunakan hialuronidase agar tidak

merusak epitop reseptor fertilisasinya. Zona pelusida diperoleh dengan memecah oosit secara manual menggunakan dua jarum tuberkulin pada bawah mikroskop stereo untuk membuang vitelusnya. Fraksinasi zona pelusida menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* pada frekuensi 25 KHz selama lima menit yang dilakukan secara bertahap. Suspensi protein zona pelusida kambing dianalisis menggunakan *sodium dodecil sulphuric acid -polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) 12% menggunakan *electrophoresis set mini protein gel* (Bio-Rad). Isolasi gZP3 dilakukan dengan elektroforesis horizontal (Bio-Rad). Kebenaran eluat dikonfirmasi dengan cara dipisahkan ulang dalam SDS-PAGE. Gel hasil SDS-PAGE gZP dan gel hasil SDS-PAGE ulang protein eluat, diperiksa dalam alat densitometer (CAMAG Software) pada panjang gelombang 573 nm. Hasil pemeriksaan dengan densitometri dimaksudkan untuk mengkonfirmasi pita-pita hasil SDS-PAGE protein zona pelusida kambing dan isolat protein gZP3.

Perlakuan Hewan Coba. Penelitian ini dilaksanakan dalam waktu enam bulan. Pemeliharaan mencit dilakukan dengan pencahayaan mengikuti cahaya matahari secara alami. Setiap dua ekor mencit dikandangkan dalam bak plastik beralas sekam yang diganti seminggu sekali, dan dengan penutup kawat kasa. Semua mencit diberikan minum dan pakan yang sama, yaitu air minum isi ulang dan pakan berupa pelet CP511 (PT. Charoen Phokhand) *ad libitum*.

Dua puluh ekor mencit betina galur Balb-C berumur 3.0-3.5 bulan dengan bobot 25-30 gram, dan pernah melahirkan, diambil secara acak dari populasi, sepuluh ekor sebagai kontrol dan sepuluh ekor yang lain sebagai perlakuan. Setelah mengalami aklimatisasi sekaligus memastikan bahwa hewan coba sedang tidak bunting, hewan coba kemudian diimunisasi. Mencit perlakuan diimunisasi dengan 40 µg gZP3 dalam larutan *Freund's adjuvant*, sedangkan mencit kontrol hanya mendapatkan suntikan larutan garam fisiologis bersamaan dengan waktu imunisasi pada mencit perlakuan. Penyuntikan pertama imunisasi, suspensi 40 µg gZP3 ditambah dengan *complete Freund adjuvant* (CFA, SIGMA 062K8930) 1:1 (v/v). Penyuntikan *booster* dilakukan dua kali, suspensi 40 µg gZP3 ditambah dengan IFA (SIGMA 062K8928) 1:1 (v/v). Penyuntikan dilakukan secara subkutan (di bawah kulit punggung) masing-masing 0.1 ml/ekor setiap kali penyuntikan dengan interval 14 hari. Tujuh hari setelah penyuntikan *booster* kedua, semua hewan coba dikumpulkan dengan pejantan fertil dengan komposisi satu pejantan untuk dua mencit betina. Pengamatan sumbat vagina sebagai pertanda terjadinya perkawinan dilakukan setiap pagi dilanjutkan pengamatan kebuntingan dan kelahiran. Pengambilan contoh darah (600-700 µl dari vena orbitalis menggunakan *capiler plain tube* 0.1 ml, menghasilkan serum 200-300 µl) untuk peneraan titer antibodi serum dilakukan sebelum penyuntikan pertama, tujuh hari setelah penyuntikan *booster* kedua, dan setelah melahirkan.

Pemeriksaan Titer Antibodi dengan ELISA. Suspensi gZP3 10 µg/ml diencerkan dua kali dengan bufer karbonat (Merck 6329-6392) kemudian diadsorbsikan pada mikroplat ELISA 100 µl/sumur dan diinkubasi pada 4 °C semalam. Mikroplat kemudian diblok dengan *buffer blocking* (1% BSA [GIBCO BRL 11018], 0.02% NaN₃ [Merck 6688] dalam PBS),

diinkubasi satu jam pada 37 °C. Selanjutnya mikroplat dicuci tiga kali dengan bufer pencuci (NaCl 0.15 M [Riedel-deHaen 31434], triton x-100 0.05% [SIGMA 103H0421], NaN₃ 0.02%).

Serum dalam beberapa pengenceran (1/40-1/40960) dimasukkan dalam tiap sumuran sebanyak 100 µl dan diinkubasi satu jam pada 37 °C, setelah itu dicuci tiga kali dengan bufer pencuci. Konjugat (*rabbit anti-mouse IgG* terlabel alkaline posfatase [SIGMA A2418]) yang diencerkan dengan *buffer blocking* (1:1.000) ditambahkan sebanyak 100 µl/sumur. Inkubasi mikroplat selama satu jam pada 37 °C. Mikroplat dicuci kembali dengan bufer pencuci kemudian ditambah substrat (larutan 4-nitrofenil posfat 2.7 mmol/liter [SIGMA 73724] dalam 1 M dietanolamin [SIGMA 45H0950], MgCl₂ 0.5 M, NaN₃ 0.02% pH 9.8) sebanyak 100 µl/sumur. Inkubasi mikroplat kembali selama 10-30 menit dalam ruang gelap. Resapan dibaca dengan ELISA *reader* (Bio-Rad) pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis Statistik. Uji statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 5%, menggunakan aplikasi Statistik SPSS (*Statistical Procedures and Service Solution*) 10.1. Analisis statistik titer antibodi sebelum imunisasi, setelah imunisasi, dan setelah melahirkan pada masing-masing kelompok dianalisis menggunakan uji Anova, dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil apabila dalam uji Anova terdapat perbedaan nyata ($P < 0.05$). Data selang waktu antara saat hewan coba dikumpulkan dengan pejantan sampai dengan saat melahirkan pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, serta jumlah anak antar kedua kelompok dianalisis dengan uji t.

Hasil Isolasi gZP3. Zona pelusida kambing pada SDS-PAGE 12% menghasilkan tiga pita protein. Sesuai dengan nomenklatur, maka berdasarkan kenaikan massa molekul relatif (M_r) nya ketiga pita protein tersebut disebut sebagai gZP1, gZP2, dan gZP3 dengan M_r berturut-turut 120, 94, dan 82 kDa (Mustofa *et al.* 2004a). Terdapat kesesuaian letak pita protein hasil SDS-PAGE ZP kambing maupun protein gZP3 eluat dengan letak kurva densitografinya. Berdasarkan luas daerah di bawah kurva densitometri, diketahui bahwa proporsi gZP1, gZP2, dan gZP3 berturut-turut 7, 30, dan 63% (Mustofa *et al.* 2006).

Zona pelusida mamalia merupakan lapisan glikoprotein ekstra seluler yang memegang peranan penting dalam inisiasi interaksi antara sel spermatozoa dan sel telur, untuk selanjutnya menghasilkan fertilisasi (Wassarman *et al.* 2001). Pengikatan antigen zona pelusida tersebut dengan antibodinya menyebabkan reseptor fertilisasi pada zona pelusida tidak dikenali oleh spermatozoa, sehingga menghambat fusi gamet dan menimbulkan kegagalan fertilisasi (Aitken *et al.* 1996).

Antibodi gZP3. Titer antibodi mencit tujuh hari setelah penyuntikan *booster* kedua (576 ± 134.92) lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan titer antibodi gZP3 serum sebelum imunisasi (48 ± 16.87). Titer antibodi serum mencit setelah melahirkan (88 ± 41.31) tidak berbeda nyata ($P > 0.05$) dibandingkan dengan titer antibodi serum yang dikoleksi sebelum imunisasi. Mencit kontrol tidak menunjukkan perbedaan nyata ($P > 0.05$) titer antibodi serum dari masing-masing waktu pengambilan contoh darah (Tabel 1).

Tabel 1. Rataan \pm simpangan baku titer antibodi serum mencit (*M. musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan protein gZP3, serta setelah melahirkan (n = 10/perlakuan)

Kelompok	Sebelum imunisasi	Setelah imunisasi	Setelah melahirkan
Kontrol	44 \pm 12.65a	46 \pm 23.03a	50 \pm 27.08a
Perlakuan	48 \pm 1687a	576 \pm 134.92b	88 \pm 41.31a

Angka yang diikuti huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata pada $P > 0.05$

Serum mencit betina kontrol dikenali oleh protein gZP3 dengan rentang titer antibodi 20-80. Hal ini menunjukkan bahwa di dalam serum hewan coba tersebut terdapat klon IgG yang dikenali oleh epitop peptida pada *back bone serine/threonine* atau pada glikan Gal - $\beta(1.3)$ - GalNAc pada gZP3. Titer antibodi tersebut tidak berubah secara nyata ($P > 0.05$) dalam perjalanan waktu penelitian.

Zhu dan Naz (1999) melaporkan bahwa terdapat homologi susunan asam amino ZP3 antar beberapa spesies pada mamalia. Dikenalnya protein gZP3 oleh serum mencit betina kontrol tersebut mengindikasikan adanya homologi susunan asam amino antara protein gZP3 dengan protein ZP3 mencit (*mice zona pellucida-3*, mZP3). Adanya homologi tersebut melandasi pemakaian protein gZP3 sebagai bahan imunokontrasepsi untuk dicoba pada mencit sebagai hewan model sebelum kelak diteliti lebih lanjut untuk diterapkan pada manusia.

Pada saat dilakukan imunisasi pada mencit betina perlakuan, beberapa epitop protein gZP3 yang homolog dengan protein epitop mZP3, langsung berinteraksi dengan beberapa klon IgG dan dengan sel-sel memori. Sel memori sensitif terhadap rangsangan oleh imunogen yang sama. Reaksi tersebut menyebabkan proliferasi cepat sel-sel memori menjadi sel plasma penghasil antibodi. Pada penelitian ini titer antibodi mencit perlakuan naik secara nyata ($P < 0.05$) dari 48 \pm 16.87 sebelum imunisasi, menjadi 576 \pm 134.92 setelah imunisasi. Menurut Abbas *et al.* (2003), respon imun yang terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas, serta spesifisitas yang tinggi. Pemaparan imunogen yang sama, tidak terjadi setelah penyuntikan *booster* kedua, sehingga titer antibodi lambat laun menurun menjadi 88 \pm 41.31 dalam waktu 91.6 \pm 4.9 hari kemudian (pada saat melahirkan).

Pada analisis *Dot blot*, diketahui terdapat reaksi positif pengenalan antibodi gZP3 asal mencit betina perlakuan dengan protein gZP3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum mencit hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3 (Mustofa 2005b).

Reversibilitas. Hewan coba kontrol melahirkan 26.5 \pm 4.30 hari, sedangkan hewan yang diberi perlakuan melahirkan setelah 91.6 \pm 4.90 hari setelah dikumpulkan dengan pejantan (Tabel 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa hewan coba kelompok perlakuan mengalami penundaan kelahiran 3.5 kali (91.6/26.5) lebih panjang ($P < 0.05$) dibandingkan hewan coba kelompok kontrol. Jumlah anak yang dilahirkan kelompok perlakuan adalah 7.80 \pm 1.48 ekor, tidak berbeda nyata

Tabel 2. Rataan \pm simpangan baku reversibilitas (selang waktu antara saat dikumpulkan pejantan dan saat melahirkan) (hari) dan jumlah anak mencit setelah diimunisasi dengan protein gZP3

Kelompok	Reversibilitas	Jumlah anak
Kontrol	26.50 \pm 4.30a	7.70 \pm 1.34a
Perlakuan	91.60 \pm 4.90b	7.80 \pm 1.48a

Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata $P > 0.05$

($P > 0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol yang melahirkan anak 7.70 \pm 1.34 ekor (Tabel 2). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa imunisasi mencit dengan gZP3 hanya bersifat kontraseptif, tidak menimbulkan abortus, kematian maupun resorpsi fetus (Mustofa *et al.* 2004b).

Pada hewan coba yang diimunisasi dengan protein yang berasal dari zona pelusida, level IgG dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. IgG tersebut akan terikat pada glikoprotein ZP3 (reseptor spermatozoa) selama oosit masih berada dalam folikel *de Graaf*. Setelah ovulasi, ikatan antara IgG dan ZP akan dilengkapi oleh ikatan antibodi yang ada dalam oviduk. Ikatan antara IgG dengan ZP menyebabkan blokade terhadap reseptor fertilisasi (Barber & Fayrer-Hosken 2000). Pada penelitian sebelumnya, titer antibodi gZP3 sebesar 640 mencegah kebuntingan pada hewan coba mencit (Mustofa *et al.* 2004b). Pada penelitian ini titer antibodi gZP3 sebesar 576 \pm 134.92 atau dengan rentangan 320-640 dapat menunda kelahiran selama 91.60 \pm 4.90 hari. Hewan coba melahirkan ketika titer antibodi gZP3 telah menurun kembali menjadi 88 \pm 41.31 atau dengan rentangan 40-160.

Masa kebuntingan mencit adalah 21 hari (Smith & Mangkoewidjojo 1988), sehingga dapat diperkirakan bahwa hewan coba kontrol kembali bunting setelah 5.5 (26.5-21) hari atau sekitar satu siklus birahi. Kesuburan hewan coba perlakuan, kembali setelah 70.6 (91.6-21) hari. Dengan dasar bahwa rata-rata panjang siklus birahi mencit (*M. musculus*) adalah lima hari (Smith & Mangkoewidjojo 1988), berarti masa efektif imunokontrasepsi gZP3 pada hewan coba model tersebut adalah 70.6/5, yaitu sekitar 14 siklus birahi. Satu siklus birahi pada hewan coba, analog dengan satu siklus menstruasi pada manusia. Rata-rata siklus menstruasi wanita adalah 28 hari (Campbell *et al.* 1993). Berdasarkan hal tersebut dapat diperkirakan masa kerja imunokontraseptif ini pada wanita adalah 14 siklus dikalikan 28 hari, yaitu 392 hari, setara dengan 13 bulan. Hal ini sesuai dengan harapan bahwa imunokontrasepsi sebaiknya bersifat reversibel dan mempunyai aktivitas panjang, sekurang-kurangnya satu tahun (Barber & Fayrer-Hosken 2000).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Hibah Bersaing XI tahun 2003-2005, atas nama Imam Mustofa. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Ditbinlitabmas Ditjen Dikti, Depdiknas yang telah membiayai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. Ed ke-5. Philadelphia: WB Saunders.
- Aitken RJ, Paterson M, van Duin M. 1996. The potential of the zona pellucida as a target for immunocontraception. *Am J Reprod Immunol* 35:175-180.
- Aulanni'am, Sumitro SB, Hardjopranjoto S, Sutiyoso, Soendoro T. 2003. Bovine zona pellucida deglycosylated (bZP3dG) and the prospect for immunocontraceptive vaccine. *Media Kedokteran Hewan* 19:117-120.
- Barber MR, Fayer-Hosken A. 2000. Possible mechanism of mammalian immunocontraception. *J Immun Reprod* 46:103-124.
- Campbell NA. 1993. *Biology*. Ed ke-3. California: The Benjamin/Cumming Publ Comp Inc.
- Mulyati S, Mustofa I, Mahaputra M. 2006. Siklus birahi dan kadar progesteron serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan sesudah imunisasi dengan bahan antifertilitas zona pelusida-3 (ZP3) kambing. *Media Kedokteran Hewan* 22:1-6.
- Mustofa I. 2005a. Identifikasi efek samping imunokonsepsi zona pelusida-3 kambing pada histologi ovarium mencit (*Mus musculus*) sebagai model. *Media Kedokteran Hewan* 21:19-22.
- Mustofa I. 2005b. Identifikasi, isolasi, dan karakterisasi reseptor fertilisasi (zona pelusida-3) kambing sebagai bahan imunokonsepsi. Penelitian eksploratif laboratorik dan fertilisasi in vitro pada hewan model [Disertasi]. Surabaya: Program Pascasarjana, Universitas Airlangga.
- Mustofa I, Mahaputra L, Dachlan YP, Rantam FA, Hinting A. 2006. Analisis densitometrik protein reseptor fertilisasi (ZP3) pada zona pelusida kambing sebagai kandidat bahan imunokonsepsi. *Media Kedokteran Hewan* 22:68-72.
- 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* 20:116-120.
- Mustofa I, Mulyati S, 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.
- 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.
- Paterson M, Wilson MR, Jennings ZA, van Duin M, Aitken RJ. 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol Hum Reprod* 5:342-52.
- Rankin T, Dean J. 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev Reprod* 5:114-121.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan dan Penggunaan Hewan Percobaan di daerah Tropis*. Surabaya: Univ Airlangga.
- Sumitro SB, Aulanni'am. 2001. Zona pellucida 3 (ZP3) has proper biochemical properties to be considered as candidate antigen for immunocontraceptive vaccine. *Reprotech* 1:51-53.
- Wassarman PM, Jovine L, Litscher ES. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biol* 3:59-64.
- Zhu X, Naz RK. 1999. Comparison of ZP3 protein sequence among vertebrate species: to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Front Biosci* 4:212-225.