

PROSPEK PENGGUNAAN GLIKOPROTEIN ZONA PELUSIDA SEBAGAI IMMUNOGEN UNTUK VAKSIN KONTRASEPSI

Titien Sumarsih

Departemen Biologi Fakultas Kedokteran UPN "Veteran" Jakarta
Jl. RS. Fatmawati Pondok Labu, Jakarta Selatan - 12450
Telp. 021 7656971

Abstract

The increase of civilization in the world, especially in the developing country makes the need create the method of contraception. An effective contraception method has successfully, controlled the fertility and so to avoid the unwanted pregnancy. The contraception methods shall have the following criteria safety, no side effects, no impact on health dearangement nor in libido and shall be reversible. Immune methods has been developed recently as the alternative of contraception methods in inhibiting fertilization, which is immunocontraception vaccine and act as one of the protection to an infection. There are severe precaution in the usage of immunocontraception vaccine, such as variation of antibody response. The longervity of the antibody wich deffens in each person. Pellucide zone glycoprotein is an extra cellular matrix surrounding mammalian oocyte that acts as a specific receptor to sperm (immunogen). Isolate ZP has been classitied into ZP, ZP2 and ZP3.

Key Words: *contraception, vaccine, immunocontraception, pellucide zone (ZP)*

PENDAHULUAN

Dengan semakin meningkatnya jumlah penduduk dunia, terutama di negara-negara berkembang, menimbulkan keinginan membuat suatu metode untuk menjarangkan kehamilan sehingga dapat mengurangi peledakan penduduk dunia. Sebagian besar penduduk dunia, bahkan di beberapa negara mencapai 75% pasangan usia reproduktif menggunakan alat kontrasepsi sebagai pilihan untuk menjarangkan kehamilan. Kontrasepsi yang efektif menyebabkan pasangan usia reproduktif dapat mengontrol fertilitasnya dan menghindari terjadinya kehamilan yang tidak diinginkan. Saat ini diperlukan suatu metode kontrasepsi yang memiliki beberapa keunggulan, seperti: aman, tidak menimbulkan efek samping, tidak mengganggu kesehatan, tidak menurunkan libido dan sedapatnya *reversibel*. *Reversibel* artinya, jika pemakaian dihentikan pada usia subur, akan dapat lagi memiliki anak alias fertil. (Baird DT, 1999).

Bahan kontrasepsi yang ideal haruslah dapat digunakan oleh kedua pasangan suami-istri. Ini untuk keadilan, dan juga demi mengurangi efek samping yang muncul kalau pemakaian berlangsung sangat lama. Pemakaian suatu bahan, yang dalam jangka waktu tertentu tidak mengganggu kesehatan dan kebugaran sek, tetapi jika dipakai dalam tempo lama, misalnya berpuluh tahun, dapat mengganggu kesehatan dan kebugaran seks. Dalam tempo pendek, misalnya suatu obat bisa *reversibel*, tetapi jika dipakai terus-menerus dalam tempo puluhan tahun, menimbulkan risiko *ireversibilitas*. Artinya, si pemakai jadi tidak subur permanen, bahkan bisa steril (mandul). (Baird DT, 1999).

Bahan kontrasepsi yang dipakai di dunia dan di negara kita dari dulu hingga sekarang ialah preparat hormonal. Preparat ini umumnya dibuat sintetis, dengan sasaran untuk menghentikan pembentukan gamet (*spermatogenesis* dan *oogenesis*). Dibuat sintetis agar dapat diproduksi dalam jumlah besar di pabrik, dan dengan demikian harganya pun murah. (Baird DT, 1999).

Selain menggunakan bahan, ada pula metode kontrasepsi lain, yaitu dengan pembedahan dan sistem penanggalan. Cara pembedahan ialah tubektomi bagi istri dan vasektomi bagi suami. Khusus untuk cara pembedahan, bagi pihak suami juga kini bisa menimbulkan masalah. Banyak darah peserta vasektomi terbukti mengandung antibodi terhadap spermanya sendiri, menyebabkan sperma itu bergumpal, *imobil* (tidak bisa berenang menuju tempat pembuahan), dan orangnya pun jadi infertil. Ini terjadi jika pada waktu dilakukan pemotongan saluran mani, terjadi kontak antara darah dengan sperma. (Baird DT, 1999).

Ada cara yang kini lebih aman dibandingkan dengan vasektomi, yaitu dengan memotong pangkal saluran mani itu tanpa menggunakan pisau, tetapi dengan arus listrik yang disebut elektro-kauterisasi. Pada prinsipnya, istri yang mendapat tubektomi juga sebetulnya dapat digolongkan kepada elektro-kauterisasi juga. Arus listrik yang dialirkan hanya beberapa detik, dan sifatnya mematri atau mengelas saluran mani langsung. Dengan cara kauter ini tindakan operasi dapat dikerjakan cepat dan aman, tanpa risiko pendarahan.

Untuk wanita kini sudah banyak sekali pilihan dapat dipakai, apakah berupa pil, suntik, atau susuk. Pil diminum 1 x sehari, suntik untuk jangka waktu 1 x beberapa bulan, sedangkan susuk bisa bertahan sekali tanam 1 x dalam 5 tahun. Bahkan kini sedang dikembangkan susuk yang setelah lima tahun tidak perlu diangkat oleh seorang dokter, karena kapsulnya akan larut di antara jaringan.

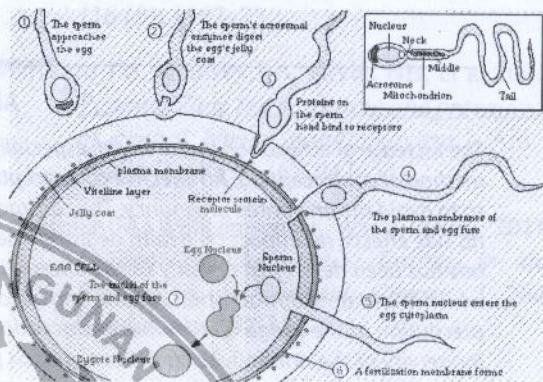
Pada beberapa tahun belakangan ini telah dikembangkan suatu alternatif kontrasepsi menggunakan metode imunologi untuk menghambat proses fertilisasi. Salah satu metode penghambatan fertilisasi yang kini sedang dikembangkan adalah melalui vaksinasi, yaitu suatu cara yang biasanya dilakukan untuk memproteksi tubuh terhadap infeksi. Dalam penggunaan vaksin imunokontrasepsi, terdapat beberapa hal yang harus diperhatikan yaitu: adanya variasi respon antibodi dan lama antibodi bertahan pada tiap individu, serta tidak semua individu memberikan keefektifan yang sama terhadap vaksin yang diberikan. (Gupta SK, 1997)

Transport dari antigen merupakan salah satu tantangan yang harus dihadapi untuk membuat vaksin imunokontrasepsi yang efektif, dan hal inilah yang menjadi titik berat penelitian-penelitian tentang vaksin *imunokontrasepsi* yang saat ini banyak dikembangkan. (Gupta SK, 1997)

PEMBAHASAN

Proses Fertilisasi

Fertilisasi adalah proses penyatuan gamet pria dan wanita, terjadi pada daerah ampulla tuba falopii. Ampulla tuba falopii adalah bagian terluas dari saluran telur dan terletak rapat dengan ovarium. Proses ini sangat kompleks dan terdiri dari beberapa tahap yang terdiri atas (1) Kapasitasi, (2) Reaksi akrosom, (3) Ikatan dengan zona pelusida, (4) Implantasi, dan (5) Perkembangan hasil konsepsi. (Johnson, MH, 2000).



Gambar 1. Proses fertilisasi.

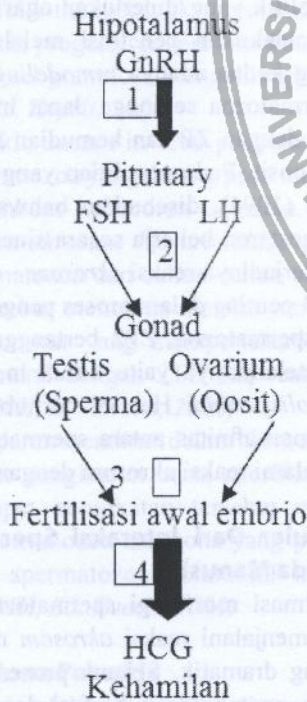
Pada proses tersebut terdapat beberapa komponen yang dapat digunakan dalam penghambatan proses fertilisasi secara imunologis. Pembentukan antibodi-melawan zona pelusida sebagai metode kontrasepsi pertama kali diajukan oleh Shivers (1972). Saat ini pengetahuan tentang biologi molekuler zona pelusida berkembang sangat pesat disertai berkembangnya pengetahuan tentang target zona pelusida. (Stoyka B, Domagala A, 2003).

Pemilihan target yang berpotensi dalam penggunaan vaksin imunokontrasepsi tergantung dari imunogenesitasnya, densitas antigen dan lokasinya. Yang merupakan target dari perkembangan vaksin imunokontrasepsi adalah sperma antigen, antigen, *Gonadotrophin releasing-hormone (GnRH)*, *Chorionic gonadotrophin*, beberapa hormon peptida (*FSH, LH, Luteinizing hormone releasing hormone*) serta hormon steroid gonad. (Stoyka B, Domagala A, 2003).

Diperkirakan antibodi yang akan terbentuk oleh vaksin imunokontrasepsi akan bekerja di saluran reproduksi wanita terutama pada tuba falopii, uterus, dan vagina, sehingga akan menghambat fertilisasi.

Pada sistem reproduksi manusia terdapat beberapa tempat yang dapat digunakan sebagai intervensi imunologik terhadap regulasi fertilisasi (lihat

gambar 2). Perkembangan gamet di bawah kontrol *gonadotropin, follicle stimulating hormone (FSH)* dan *luteinizing hormone (LH)*, yang disekresikan *pituitary* dan mencapai gonad melalui aliran darah. Netralisasi aksi LH dan/atau FSH pada organ targe (ovarium dan testis) akan dihalangi oleh sirkulasi antibodi dan hingga mengganggu pematangan oosit dan spermatozoa. Sekresi *gonadotropin* diatur oleh GnRH yang disekresi oleh hipotalamus. Netralisasi *human chorionic gonadotropin (HCG)* oleh berkembangnya antibodi juga mengarah ke infertilitas. Respon imun dapat ditingkatkan terhadap faktor permukaan yang unik dari gamet sehingga mengganggu proses fertilisasi. Beberapa penelitian klinik telah memperlihatkan hubungan antibodi terhadap antigen sperma dengan *unexplained* infertilitas lain. Auto-antibodi terhadap ZP juga telah didokumentasikan. Eksperimen tersebut ada secara alami yang mengindikasikan bahwa pemblokkan imunologik pada fertilitas merata dalam situasi manusia, tanpa ada efek samping dan akan mudah dikerjakan untuk mengatur fertilitas dengan vaksin imunokontrasepsi. (Gupta SK, P. Jethanadani, 1997).



Gambar 2. Skematik garis besar proses reproduktif.

Struktur Zona Pelusida

Zona pelusida adalah suatu matriks glikoprotein ekstraseluler yang mengelilingi oosit. Se-

cara mikroskopik lapisan ini terdiri dari lapisan dalam yang padat dengan pori-pori kecil dan lapisan luar dengan pori-pori yang lebih besar. Secara spesifik matriks ZP terbentuk dari filamen-filamen yang saling berhubungan dengan panjang masing-masing 2-3 μm . dan masing-masing filamen berisi suatu struktur berulang 14-15 nm, sementara ZP2-ZP3 *heterodimer*, dan ZP1 yang bertanggung jawab untuk *cross-linking filamen* ini, yaitu ZP1, ZP2, ZP pada tikus terdiri atas tiga protein dan ZP3. Urutan asam amino yang utama ZP1 (623 asam amino), Zp2 (713 asam amino) dan Zp3 (424 asam amino) di mana pada awalnya disimpulkan dari *full-lenght* cDNA. Masing-masing zona protein disatukan sebagai rantai *polypeptide* yang dimulai dengan urutan N-Terminal dan C-Terminal diikuti oleh suatu ekor *cytoplasmic* pendek atau singkat. Urutan signal dibelah di *reticulum endoplasmic* yang membangkitkan N-Terminal dewasa dari ZP1, Zp2 dan Zp3. Seperti ke tiga lintasan protein sampai sel, mereka adalah secara ekstensif *glycosylated* dan rantai sisi karbohidrat resultan meliputi dengan kasar separuh dari massa dari tiap protein. (Sinowatz F E, 2001).

Zona pelusida di bawah mikroskop electron terlihat seperti jaringan pola geometris dengan penetrasi yang memperlihatkan lapisan dalam yang kompak dengan pori-pori yang kecil dan sebuah lapisan luar yang tersusun longgar dengan pori-pori yang besar. Selanjutnya, matriks ZP terdiri atas filamen-filamen yang saling berhubungan dengan panjang masing-masing 2-3 μm , dan setiap filamen mengandung 14-15 nm struktural berulang, diperkirakan sebagai *heterodimer* ZP2-ZP3, dan ZP1 yang bertanggung jawab terhadap ikatan silang filamen tersebut. Suatu model struktural ZP, berdasarkan pada biokimia dan analisis ultrastruktural ZP tikus, yang melibatkan filamen panjang dari suatu ZP2 dan ZP3 *heterodimer* yang berulang. ZP1 memberikan integritas struktural ZP dengan pengikatan silang filamen ZP2 dan ZP3 melalui ikatan *disulfide*. Berdasarkan perbedaan komposisi protein antar spesies, belum jelas jika struktur ZP tikus dapat diaplikasikan pada mamalia lainnya.

Biokimia Alami Glikoprotein Zona Pelusida

Secara biokimia ZP terbentuk dari tiga komponen yang juga berfungsi dalam proses imunologis. Ketiga komponen itu disebut dengan ZP1, ZP2 dan ZP3, dan berdasarkan ukuran mRNA-nya disebut sebagai ZPA (ZP2), ZPB (ZP1) dan ZPC (ZP3), dimana ZPA mempunyai ukuran yang terpanjang dan ZPC yang terkecil. Identifikasi masing-masing ZP dapat dilihat pada tabel di bawah ini: (Gupta SK, P. Jethanadani, 1997).

Tabel 1.

Karakteristik dari glikoprotein zona pelusida tikus (manusia berada dalam tanda kurung). (Johnson MH, 2000)

Nama	Genetik	Biokimia	Fungsi
ZP1	Kromosom 19: 12 exon sepanjang 6,5 kb (12 sepanjang 11 kb)	Mr 185–100.000 (90–110.000): 653-aa 70 kDa peptida (540-aa): <i>homodimer</i> dengan ikatan <i>disulfida</i> : 9 % berada pada jumlah <i>male</i> dari kombinasi ZP2 & ZP3	Sebagai pengikat slang ZP2 ke ZP 3 Setelah pelapasan ganula kortikal, ikatan silang ditingkatkan
ZP2	Kromosom 7: 18 exon sepanjang 12,1 kb (19 sepanjang 13 kb)	Mr 120–140.000 (64–78.000): 713-aa 80 kDa peptida (715-aa); rasio <i>molar</i> dengan ZP3 = 1 : 1, mungkin untuk <i>heterodimer</i> yang menyusun filamen zona	Mengikat spermatozoa yang bereaksi akrosom dan memfasilitasi perjalanan melewati zona. Setelah pelepasan granula kortikal, sebagian besar diubah menjadi ZP2 oleh aktivitas protease
Zp3	Kromosom 5: 8 exon sepanjang 8,6 kb (8 sepanjang 18,3 kb)	Mr 83.000 (57-73.000): 424-aa 46 kDa peptida (42-aa)	Mengikat kepala sperma utuh melalui reseptor β 1,4-galaktosil transferase. Setelah pelepasan granula kortikal, β -hexosaminidase B mencernakan reseptor oligosakarida pada glikoprotein ZP3.

Asam nukleat dan urutan asam amino yang disimpulkan dari tiga zona protein tersedia dari beberapa jenis. ZP1 pada manusia terdiri atas 11 exons (kurang satu dari tikus; exon 2 menghadirkan dua exons dengan suatu intron yang kecil), ZP2 terdiri dari 19 exons (satu lagi dibanding tikus) dan ZP3 terdiri dari 8 exons (sama seperti tikus) dan mereka mengkode asam amino *polypeptides* dari 540, 745 dan 424. (Gupta SK, 1997). Ada dua daerah yang sangat *hydrophobic* di N-And C termini yang mewakili urutan isyarat pada *transmembrane*.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Millar (1991) diketahui bahwa kerja mRNA untuk mengkode ketiga ZP glikoprotein berubah-ubah. Selama fase oogenesis awal, kerja mRNA mengkode ZP glikoprotein akan meningkat, dan pada fase akhir terdapat penurunan dan pada saat ini oosit berovulasi. Sedangkan pada penelitian oleh Grootenhuis (1996) didapatkan bahwa ZP1 (ZPB) terdapat pada folikel sekunder dan tersier, sedangkan pada folikel primordial, folikel primer dan folikel tersier tidak ditemukan. ZP3 (ZPC) terdapat pada oosit di sepanjang fase *folikulogenesis*. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa ZP glikoprotein pada manusia diproduksi dan disekresi pada fase

yang spesifik dari proses *folikulogenesis* dan sel granulosa dipikirkan berpengaruh terhadap sintesis ZP glikoprotein. (Miller LA, BE. John, GJ. Killian, 2000).

Fungsi Zona Pelusida

Zona pelusida merupakan salah satu aspek yang penting dalam proses fertilisasi karena merupakan lini pertama pengenalan dan pengikatan spermatozoa dengan oosit dalam suatu ikatan yang spesifik dan penting pula dalam mengaktifkan proses fertilisasi selanjutnya. Dalam proses pengenalan dan pengikatan spermatozoa, diketahui bahwa yang berperan sebagai reseptor primer adalah ZP3. Pada tahap selanjutnya yaitu reaksi akrosom, diketahui bahwa ZP pada beberapa spesies termasuk pada manusia merupakan stimulus untuk memulai terjadinya reaksi akrosom. Akrosom adalah suatu organel sel yang mirip *lisosom* yang berisi berbagai macam enzim yang keluar pada saat terjadinya reaksi akrosom. Reaksi ini merupakan salah satu proses *eksositosis* yaitu terjadinya penyatuan vesikel intrasel dengan membran sel bagian dalam yang diikuti oleh pelapasan isi dari vesikel. Reaksi ini terdiri dari 2 tahap yaitu yang pertama pelepasan enzim proteolitik yang diperlukan agar spermatozoa dapat melakukan penetrasi melalui matriks ZP, dan yang kedua adanya *remodeling* dari permukaan spermatozoa sehingga dapat meneruskan proses adesi dengan ZP dan kemudian melakukan fusi dengan oosit. Pada penelitian yang dilakukan oleh Roldan (1994), disebutkan bahwa ZP3 dan hormon progesteron bekerja secara sinergis dalam menginduksi terjadinya reaksi *akrosom*.

Jika ZP3 penting dalam proses pengenalan dan pengikatan spermatozoa, ZP2 bertanggung jawab atas proses selanjutnya yaitu untuk menghambat terjadinya *polispermia*. Hal ini berhubungan dengan penurunan afinitas antara spermatozoa yang sudah mengalami reaksi akrosom dengan ZP.

Biologi Seluler Dari Interaksi Spermatozoa-Zona Pelusida Manusia

Transformasi morfologi spermatozoa terkapitasi dapat menjalani reaksi *akrosom* merupakan kejadian yang dramatik. Selama proses, *akrosom* membengkak, membrannya berfusi dengan membran plasma, terbentuk vesikula dan kandungan vesikel *akrosom* dan membran dalam *akrosom* mengalami proses *eksositosis*. Reaksi akrosom berhubungan dengan peningkatan kalsium intraseluler dan cAMP, pH intraseluler dari sekitar 7,1–7,5 yang dapat bekerja secara sinergis dengan kalsium. (Johnson MH, BJ. Everit, 2000)

Secara umum telah diterima bahwa ZP3 yang bertanggung jawab untuk reaksi *akrosom*. Spermatozoa terkapasitasi mengikat secara spesifik pada komponen *oligosakarida* yang mengandung *galaktosa* pendek dari glikoprotein asam yang besar dalam proses spesifik-spesifik. Tempat terikatnya sperma berada pada membran plasma pada akrosom dan telah diidentifikasi sebagai α 1,4-*galaktosil transferase*. Setelah terikat, *oligosakarida* lain dan daerah protein dari glikoprotein ZP3 berinteraksi dengan membran plasma sperma dan melalui suatu aksi yang melibatkan protein G, menstimulasi masuknya kalsium dan kenaikan pH. Reaksi *akrosom* terjadi, kemudian reseptor untuk ZP3 menghilang bersama vesikula membran selama reaksi *akrosom*, pengikatan sperma ke ZP3 hanya sebentar. Sebagai tambahan, *akrosom* melepaskan α -*hexosaminidase* B yang mencernakan reseptor lokal ZP3, sehingga mencegah pengikatan selanjutnya.

Kini telah diketahui bahwa progesteron dapat juga menstimulasi masuknya kalsium ke dalam sperma, mengarah ke stimulasi dari *adenil siklase* dan peningkatan cAMP. Aktivitas protein kinase C juga meningkat dan penting untuk reaksi *akrosom* yang diinduksi oleh progesteron. Produksi progesteron dari folikular meningkat terutama saat ovulasi dan mungkin progesteron terbawa dalam massa kumulus dari sel granulosal mengelilingi oosit. (Johnson MH, BJ. Everit, 2000)

Mungkin secara in-vivo progesteron bereaksi pada spermatozoa yang datang pada massa kumulus untuk membuat kebocoran *akrosom*, melepaskan enzim *intra-akrosom hialuronidase* pada permukaan spermatozoa dan cairan-cairan sekelilingnya. Enzim tersebut mencerna matriks intraseluler dari asam *hialuronat* yang mempertahankan kumulus oosit, interaksi dengan ZP3 dan reaksi *akrosom*. (Johnson MH, BJ. Everit, 2000)

Pemaparan membran dalam akrosom mengungkap tempat pengikatan baru, spesifik pada untuk ZP2. Tempat pengikatan tersebut menahan hubungan spermatozoa dan zona yang penting untuk perjalanan spermatozoa melalui ZP menuju oosit. (Johnson MH, BJ. Everit, 2000)

Antigen Zona Pelusida

Seperti telah disebutkan di atas ZP adalah matriks ekstraselular yang memiliki oosit matang, dan penting dalam beberapa tahap proses fertilisasi mulai dari merangsang terjadinya reaksi *akrosom*, pengikatan spermatozoa, dan menghambat terjadinya polispermia. Antigen ZP akan menginduksi terjadinya infertilisasi melalui 2 cara (1) Pembentukan antibodi yang dapat menghambat reseptor sper-

matozoa pada ZP, dan (2) Sel T sitotoksik sebagai perantara destruksi folikel ovarium.

Antigen terhadap ZD terdiri dari rangkaian asam amino, struktur asam amino, dan struktur karbohidrat yang bervariasi di antara spesies yang ada. Glikoprotein ZP diketahui merupakan komponen yang dapat menimbulkan respon imun yang besar, mengakibatkan penurunan kemampuan fertilisasi sehingga merupakan salah satu yang dapat digunakan sebagai imunokontrasepsi. Dalam penggunaan glikoprotein ZP, penting diperhatikan adalah bahwa antibodi yang timbul harus dapat mempengaruhi pengikatan spermatozoa, namun tanpa memberikan efek terhadap perkembangan folikel ovarium.

Dalam laboratorium, pengembangan model primata digunakan monyet bonnet atau *Macaca radiata* yaitu primata dengan evolusi dan fisiologi reproduksi yang mirip dengan manusia. Dalam percobaan tersebut dilakukan kloning dari gen ZP1, ZP2 dan ZP3 untuk menguji imunogenesitas dan keefektifannya sebagai kontrasepsi. Ternyata didapatkan hasil bahwa ZP3 memiliki kemiripan terbesar (93,9%) dengan manusia. Oleh karena itu dikembangkan imunokontrasepsi menggunakan ZP3 dari monyet bonnet.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Martinez (2000) dilakukan perbandingan antara penggunaan imunisasi menggunakan protein ZP rekombinasi manusia ZPA, ZPB dan ZPC secara terpisah dan secara kombinasi pada monyet jenis *Macaca fascicularis*. Ternyata imunisasi dengan ZPB rekombinasi manusia menyebabkan monyet menjadi infertil untuk 9-35 bulan, sedangkan pada babon infertilitas akan menjadi 9-20 bulan. Studi ini merupakan studi pertama di mana protein ZP rekombinan dapat berfungsi sebagai imunokontrasepsi yang efektif tanpa adanya gangguan terhadap siklus menstruasi dan tidak menimbulkan gangguan patologis ovarium. Antibodi yang terbentuk pada hewan ini menyebabkan terjadinya penghambatan terhadap proses fusi antara spermatozoa dan oosit.

Penggunaan antibodi monoklonal terhadap ZP3 memperlihatkan suatu kontrasepsi yang bersifat *reversibel*, dengan keefektifan tinggi, dan untuk jangka panjang pada percobaan terhadap tikus betina dengan ZP yang telah dihumanisasi. ZP tikus betina yang dihumanisasi artinya adalah zona pelusida yang mengandung ZP1 dan ZP2 tikus, dengan ZP3 manusia. Antibodi monoklonal Abs MA-809, -811, 813 dan -825 memperlihatkan inhibisi pengikatan spermatozoa manusia dengan zona protein manusia secara bermakna.

Hardy dkk (2003), membandingkan penggunaan rekombinasi ZP3 tikus (mZP3) yang diekspresi-

kan pada mamalia dengan yang diekspresikan pada serangga sebagai antigen imunokontrasepsi. Dari hasil penelitian tersebut didapatkan bahwa terjadi penurunan fertilitas pada tikus betina yang telah diimunisasi menggunakan rekombinasi protein mZP3 yang diekspresikan pada sel mamalia dan hal ini tidak terjadi pada yang serangga.

Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Xiang dkk (2003) menggunakan antibodi terhadap protein ZPC sebagai imunokontrasepsi. Seperti yang telah disebutkan di atas bahwa glikoprotein ZPC merupakan reseptor spermatozoa yang utama dalam proses fertilisasi. Penggunaan ZPC sebagai prototipe kontrasepsi vaksin telah dikembangkan oleh beberapa peneliti sebelumnya, begitu pula penelitian tentang antibodi monoklonal yang bekerja langsung terhadap ZPC telah digunakan untuk menghambat fertilisasi melalui imunisasi pasif, bagaimanapun keamanan vaksin kontrasepsi ini belum sepenuhnya didapat. Pada penelitian tersebut penyuntikan hewan betina menggunakan sebagian atau seluruh protein ZPC menimbulkan efek samping berupa gangguan pertumbuhan ovarium dengan hilangnya oosit dan fungsi ovarium. Oleh karena itu pada penelitian ini diharapkan dapat dihasilkan vaksin ZPC yang menghasilkan respon imun yang tinggi terhadap ZPC tanpa adanya efek samping. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa vaksin antibodi anti rekombinan ZPC (rZPC) yang dibentuk dari plasmid (pCMV4-rZPC) dapat menghambat terjadinya fertilisasi tanpa gangguan perkembangan folikel yang normal. Selain itu, dari segi keamanan ternyata imunisasi pada tikus dengan pCMV4-rZPC akan menurunkan respon sel T-sitotoksik terhadap ZP sehingga menghambat terjadinya gangguan fungsi reproduksi. Sehingga vaksin ini dapat dikembangkan sebagai salah satu vaksin kontrasepsi.

Beberapa Penelitian Pada Pengembangan Imunokontrasepsi Zona Pelusida

Penelitian imunogen yang terbuat dari peptida sintetik untuk pengembangan vaksin kontrasepsi dengan dasar ZP dilakukan oleh Afzalpurkar dkk 1997. Observasi terhadap campuran dari antibodi anti-peptida terhadap *porcine* ZP3 (~ ZP3) secara efektif menghambat pengikatan sperm-ZP *porcine in-vitro*, sedangkan antibodi anti-peptida tunggal gagal. (Gupta SK, Srivastava, S. Choudhury, 2004)

Miller dkk (2000) melakukan penelitian terhadap penggunaan imunokontrasepsi terhadap pengontrolan reproduksi sekumpulan rusa ekor putih (*Odocoileus virginianus*). Bahan yang digunakan adalah ZP *porcine* asli (pZP) dan tiga rekombinan ZP kelinci (RC55, RC75a dan kombinasi RC55,

RC75a dan RC75b) yang diekspresikan dalam suatu vektor *E.coli* peX-2 sebagai fusi protein *cro-b-galactosidase*. Dosis awal 500 ig dan booster nya setelah 3-7 minggu. Terdapat 5 kelompok, di mana titer antibodi pada kelompok rekombinan adalah 1000 atau kurang, dibandingkan dengan kelompok pZP sebesar 128.000. Penurunan fertilitas pada kelompok yang diimunisasi dengan rekombinan ZP kelinci kurang efektif dibandingkan dengan kelompok dengan pZP. Pemberian kombinasi antigen tidak membuktikan penurunan kelahiran anak rusa secara signifikan. (Gupta SK, Srivastava, S. Choudhury, 2004)

Govind dan Gupta (2000) mengimunisasi empat babon betina (*Papio anubis*) dengan rekombinasi glikoprotein ZPB monyet bonnet (*Macaca radiata*) yang diekspresikan dalam *E.coli* SG13009 sebagai fusi protein *polihistidin* (His₆) dan dikongjugasikan diphtheria toxoid (DT) dengan menggunakan Squalene dan Arlacel-A (ratio 4 : 1) sebagai ajuvan dan SPLPS sebagai ajuvan tambahan pada injeksi pertama. Semua hewan yang diimunisasi memperlihatkan respon antibodi yang baik terhadap r-bmZPb, siklus ovulasi berlanjut tanpa gangguan. Keberadaan titer antibodi anti r-bmZPB bersirkulasi yang tinggi > 2x 10³ antibodi/unit, hewan yang diimunisasi gagal konsepsi setelah dikawinkan dengan jantan fertil. Kehamilan terjadi setelah penurunan titer antibodi anti r-bmZPB, 1,95 x 10³ antibodi/unit. Maka imunisasi dengan ZPB dapat digunakan untuk imunokontrasepsi, tanpa gangguan pada ovarium. (Govind CK, Gupta SK, 2000).

Penelitian oleh Hinsch dkk (1998) dan Hasegawa dkk (2002) mengungkapkan bahwa antibodi poliklonal terhadap peptida sintetik yang berhubungan dengan hZP2 (human ZP2, residu asam amino 50-67 dan 541-555) juga secara efektif menghambat pengikatan sperma ZP manusia *in-vitro*. (Hasegawa A, dkk, 2002).

Telah dilakukan penelitian oleh Xiang dkk (2003) dengan menggunakan daerah epitop kelinci (rZPC, asam amino 263-415) sebagai imunogen, dikonstruksi menjadi plasmid pCMV4-rZPC dalam vektor pCMV4 sebagai vaksin pCMV4-rZPC. Tikus yang diimunisasi dengan pCMV4-rZPC : (1) 60 % tikus betina infertil setelah 6 minggu imunisasi, (2) Mengembangkan antibodi anti-rZPC yang mengikat ZP ovarium *in situ*, dan (3) Antibodi anti-rZPC yang mengikat ZP ovarium hewan normal *in vitro*. Hasil yang diperoleh dapat menghasilkan antibodi anti-rZPC dari vaksin gen pCMV4-rZPC dan tidak mengganggu perkembangan folikuler. ((Xiang RL, dkk, 2003).

SIMPULAN

Di Indonesia, masalah kepadatan penduduk dewasa ini masih merupakan problem yang memerlukan pemecahan. Oleh pemerintah telah dilancarkan program Keluarga Berencana, yang bertujuan untuk membatasi kelahiran.

Kontrasepsi yang efektif menyebabkan pasangan usia reproduktif dapat mengontrol fertilitasnya dan menghindari terjadinya kehamilan yang tidak diinginkan.

Pada beberapa tahun belakangan ini telah dikembangkan suatu alternatif kontrasepsi dengan menggunakan metode imunologi untuk menghambat proses fertilisasi. Salah satu metode penghambatan fertilisasi yang kini sedang dikembangkan adalah melalui vaksinasi, yaitu suatu cara yang biasanya dilakukan untuk memproteksi tubuh terhadap infeksi.

ZP merupakan salah satu aspek yang penting dalam proses fertilisasi karena merupakan lini pertama pengenalan dan pengikatan spermatozoa dengan oosit dalam suatu ikatan yang spesifik dan penting pula dalam mengaktifkan proses fertilisasi selanjutnya. Dalam proses pengenalan dan pengikatan spermatozoa, diketahui bahwa yang berperan sebagai reseptor primer adalah ZP3. Beberapa senyawa yang berperan sebagai inductor reaksi *akrosom* telah berhasil diidentifikasi, di antaranya adalah inductor biologis yaitu senyawa glikoprotein ZP subtype 3 (ZP3).

Protein ZP rekombinan dapat berfungsi sebagai imunokontrasepsi yang efektif tanpa adanya gangguan terhadap siklus menstruasi dan tidak menimbulkan gangguan patologis ovarium. Antibodi yang terbentuk pada hewan ini menyebabkan terjadinya penghambatan terhadap proses fusi antara spermatozoa dan oosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Baird DT, Glasier AF. 1999, *Science, medicine and the future contraception*. BMJ 1999;319: 969 – 972.
- Govind, C.K., S.K. Gupta. 2000, *Failure of female baboons (Papio anubis) to conceive following immunization with recombinant non-human primate zonapellucida glycoprotein-B expressed I E.coli*. Vaccine 18:2970 – 8
- Greenhouse S, Castle PE, Dean J. 1999, *Antibodies to human ZP3 induce reversible contraception in transgenic mice with 'humanized' zonae pellucidae*. Hum Reprod 1999 ; 14: 593 – 600
- Gupta SK et al., 1997, *Prospects of zona pellucida glykoproteins as imunogens for contraceptive vaccine*. Hum. Reprod 1997 : 3 : 311-324.
- Gupta,S.K., P. Jethanadani, A. Afzalpurkar, R. Kaul dan R. Santhanam. 1997, *Prospects of zona pellucida glycoprotein as immunogen for contraceptive vaccine*. Human Reproduction Update Vol 3, No.4.
- Gupta,S.K., N. Srivastava, S.Choudhury, A.Rath, N.Sivapurapu, G.K. Gahlay dan D. Batra. 2004. *Review: Update on Zona Pellucida Glicoproteins based Contraceptive Vaccine*. Journal of Reproductive Immunology 62 : 79-89.
- Hasegawa, A., Y.Hamaa, M.Shigeta, K. Koyama. 2002, *Contraseptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA)*. J.Reprod.Imunol. 53:91-8.
- Johnson,M.H. dan B.J.Everitt., 2000, *Essential Reproduction*. 5th ed. Blackwell Science Ltd., Oxford :285.
- Miller, L.A., B.E. John, G.J. Killian. 2000, *Immuncontraception of white-tailed deer using native and recombinant zona pellucida vaccines*. Anim, Reprod. Sci. 63 : 187-95.
- Sinowatz, F., E. Topfer-Petersen, S. Kolle dan G. Palma. 2001, *Functional Morphology of the Zona Pellucida*. Anat. Hisol. Embryol. 30 : 257 – 263
- Stoyka B, Domagala A, Kurpisz M. 2003, *Molecular targets for immuncontraception*. AITE 2003 ; 51 : 45-49.
- Xiang, R.L., F.Zhou, Y.Yang, J.P. Peng. 2003, *Construction of the plasmid pCMV4-rZP DNA vaccine and analysis of its contraceptive potential*. Biol. Reprod. 68:1518-24.