

## SPECIFICITY OF ANTIBODY BOVINE ZONNA PELLUCIDAE 3 (ANTI-bZP3) TO RABBIT ZP3 BASED ON bZP3 AS CONTRACEPTIVE ANTIGENS

### Spesifitas Antibodi *Bovine Zona Pellusida 3 (Anti-bZP3)* Terhadap ZP3 Kelinci Berbasis *bZP3* Sebagai Antigen Kontraseptif

Edwin Widodo<sup>1,\*</sup>, and Aulanni'am<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Human Physiology Lab, Medical Faculty, Brawijaya University  
Jl. Veteran, Malang-East Java, Indonesia 65145

<sup>2</sup> Biochemistry Lab, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Brawijaya University  
Jl. Veteran, Malang-East Java, Indonesia 65145

Received 25 February 2005; Accepted 28 April 2005

#### ABSTRACT

*Zonna pellucidae* can be develop as antigen potential candidates based on reversible immunocontraceptive vaccines. Immunogenic sites of bovine zonna pellucidae 3 (bZP3) could stimulated the presence of anti-bZP3 which be located on rabbit ZP and inhibit sperm-egg interaction on fertilization process. Purpose of this research is to detect spesific binding anti-bZP3 to rabbit oocytes using dot blotting and ELISA method. Sub cutan induction of bZP3 with Freund's adjuvant, CFA (Complete Freund's Adjuvant) for initial immunization and following by IFA (Incomplete Freund's Adjuvant) at the 14<sup>th</sup> day and 39<sup>th</sup> day. Control female rabbit injected by Tris-CI buffer diluted in Freund's adjuvant without bZP3 antigen. Rabbit serum injected to rat for producing Rat Anti Rabbit Anti-bZP3. This research concludes spesific binding of anti-bZP3 with increasing purple colour on dot blotting methods. Anti-bZP3 increasing on 24<sup>th</sup> day and 31<sup>th</sup> day and still until 48<sup>th</sup> day. Measurement with ELISA methods showed increased titer on OD<sub>405</sub>. Highest titer showed on 31<sup>th</sup> day post immunization. Anti-bZP3 synthetized by bZP3 induced on rabbit detectable by immunohistochemistry methods on late primary oocytes, early secondary oocytes, growing secondary oocytes, and oocytes on de Graaf follicular phase.

**Keywords:** Dot blotting, ELISA, bZP3, anti-bZP3

#### PENDAHULUAN

Imunokontrasepsi menggunakan glikoprotein pada zona pellusida (ZP) mamalia dapat diharapkan karena keberadaan ikatan antibodi spesifik pada antigen ZP dapat menghambat fertilitas dan tidak menimbulkan kerusakan [1]. Pada umumnya kontrasepsi bekerja melalui salah satu dari mekanisme berikut, yaitu menghambat terjadinya ovulasi, mematikan sperma atau menghalangi usaha sperma menuju sel telur pada saluran reproduksi wanita [2,3,4]. Sumitro dan Aulanni'am [5] mengembangkan *bovine zona pellusida 3 (bZP3)* sebagai calon imunokontrasepsi yang potensial. Hal ini mengingat limbah ovarium sapi dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) yang belum termanfaatkan dengan optimal dapat digunakan sebagai sumber *bZP3*.

Zona pellusida 3 berikatan dengan akrosom yang belum tereaksi pada kepala sperma namun gagal berikatan dengan akrosom pada sperma yang telah tereaksi menunjukkan peranan ZP3

sebagai reseptor primer pengenalan sperma [1,6,7,8]. ZP bersifat sangat imunogenik dan dalam penggunaannya hanya membutuhkan titer antibodi dalam jumlah yang rendah dan bersifat sementara [9]. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan antigen *bZP3* pada kelinci tidak menimbulkan perubahan dalam proses folikulogenesis dan titer anti-*bZP3* masih ada hingga hari ke-100 [10]. Melalui uji pengikatan reseptor spermatozoa yang dilakukan oleh Aulanni'am dan Susilawati [11] diketahui bahwa interaksi antara *bZP3* dengan spermatozoa terhambat setelah penambahan anti-*bZP3* pada *bZP3*.

Induksi zona pellusida 3 dari spesies yang berbeda menyebabkan terbentuknya antibodi spesifik pada targetnya yakni pada ZP3 dari individu yang diimunisasi sehingga menyebabkan perubahan konformasi secara utuh rantai peptida pada zona pellusida sehingga spermatozoa tidak mengenali reseptornya pada sel telur. Pembentukan anti-*bZP3* yang akan berikatan pada zona pellusida 3 menghilangkan fungsi reseptor

\* Corresponding author.

Email address : edwin@brawijaya.ac.id

primer pada ZP3, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui kespesifikan anti-bZP3 pada zona pellusida 3 oosit.

## METODE PENELITIAN

### Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, Laboratorium Biomolekuler, Laboratorium Mikroteknik dan Laboratorium Biokimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

### Hewan Penelitian

Penelitian ini menggunakan 2 kelompok kelinci betina berumur  $\pm$  3 bulan, yaitu kelinci kontrol dan kelinci yang diinduksi bZP3. Induksi bZP3 pada kelinci dilakukan secara subkutan pada kelinci dengan imunisasi pertama dan 2 kali booster dengan *Freund's Adjuvant*. Kelinci kontrol diinjeksi buffer Tris Cl dalam adjuvan. Serum kelinci diambil pada hari ke-10, 17, 24, 31, 38, dan 48 pasca imunisasi.

### Prosedur Kerja

#### Isolasi bZP3

Ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis 0,9 % dan disimpan dalam NaCl fisiologis, penisilin 0,006 g/100 mL dan streptomisin 0,01 g/100 mL pada suhu 38°C maksimal 5 jam setelah pematangan. Ovarium sapi disimpan dalam kondisi beku (*freeze*). Ovarium diaspirasi dalam NaCl fisiologis 0,9 % dengan spuit berisi larutan *phospo buffer saline* (PBS) dingin (2-4°C) steril  $\pm$  1 mL. Oosit dipecah dalam larutan PBS mengandung 50  $\mu$ M *phenyl metil sulfonyl flouride* (PMSF) sehingga didapatkan zona pellusida sapi (*bovine Zona Pellucida/bZP*) kemudian disentrifugasi 750 g pada suhu 4°C selama 30 menit. Endapan ditambahkan 5  $\mu$ L Tris-Cl 20mM dan disimpan dalam freezer bersuhu -20°C.

Elektroforesis SDS PAGE menggunakan sistem *discontinuous* dengan *separating gel* 10 % dan *stacking gel* 3 % pada 200 V dan *constant current* 20 mA. Pita (*band*) protein bZP3 hasil elektroforesis SDS-PAGE dipotong dan dielektroelusi pada suhu 4°C semalam kemudian dipresipitasi menggunakan etanol absolut. Hasil presipitasi ditambahkan 600  $\mu$ L Tris-HCl 20 mM.

#### Induksi bZP3 Pada Kelinci dan Purifikasi Anti-bZP3

Injeksi inokulum dalam volume kecil (200  $\mu$ L) pada beberapa titik injeksi. Titik injeksi terpisah minimal 1 inci untuk menghindari overlapping inflamasi. Serum yang didapat dipurifikasi dengan

metode SAS 50% (*Saturated Amonium Sulphat*) sesuai metode yang digunakan oleh Goer [12].

#### Produksi Antibodi Anti-bZP3 (Anti anti-bZP3) Pada Tikus

Antiserum yang diperoleh dari kelinci yang telah diinduksi bZP3 dipurifikasi dengan metode SAS [12]. Serum ditambahkan adjuvan dan diinduksikan pada tikus sesuai jadwal imunisasi (produksi antibodi) pada tikus dan kelinci. Serum yang didapat dari tikus tersebut dipurifikasi dengan SAS 50%.

#### Pengujian Spesifitas Anti-bZP3 Terhadap Antigen bZP3

##### Western Blotting

Pita protein bZP3 pada gel hasil elektroforesis ditransfer ke membran nitroselulose selama 12 jam pada 25 Volt pada suhu 4°C. Membran di-*blocking* dalam PBS mengandung *Tween* 0,05% dan *skim milk* 5% selama 1 jam dilanjutkan dengan inkubasi menggunakan antibodi anti-bZP3 (1:200) semalam dan antibodi sekunder AP *Conjugated* (1:2500 dalam *Tris Buffer Saline / TBS*) selama 1 jam suhu ruang. Selanjutnya dideteksi pita protein atau antigen dengan penambahan substrat *western blue* (dalam ruang gelap).

##### Dot Blotting

Antigen bZP3 sebanyak 20  $\mu$ L dalam NaN<sub>3</sub> 1% (1:4) ditetaskan pada membran nitroselulosa yang telah dibasahi PBS yang terangkai pada alat *Dot Blotter*. Membran di-*blocking* dengan PBS-Skim 5% selama 2 jam dilanjutkan inkubasi membran menggunakan antibodi anti-bZP3 (1:200) selama 2 jam dan antibodi sekunder *Anti Rabbit IgG Alkaline Phospatase (AP) Conjugated* (1:2500) 1 jam. Membran selanjutnya diinkubasi dalam substrat *Western Blue* (dalam ruang gelap) selama 30 menit. Membran dikeringkan dan diamati ada tidaknya noda berwarna biru gelap.

#### Pengukuran Titer Anti-bZP3 Melalui Metode ELISA

Antigen bZP3 (kadar antigen 1  $\mu$ g/mL) dalam *coating buffer* (1: 9) di-*coating* pada *plate* ELISA selama semalam pada suhu 4°C dilanjutkan dengan *blocking buffer* (BSA 1% dalam PBS) 50  $\mu$ L / *well* selama 2 jam suhu ruang. *Plate* di-*coating* dengan antibodi primer anti-bZP3 (50  $\mu$ L / *well*) 2 jam dilanjutkan *coating Anti Rabbit IgG AP Conjugated* (1:2500) 2 jam pada suhu ruang. *Plate* ELISA ditambahkan substrat *para-nitrophenyl phosphate* dalam dietanolamin 10% selama 30 menit suhu ruang kemudian ditambahkan NaOH 3M (50  $\mu$ L / *well*) sebagai *stop reaction*. Setelah 15 menit,

plate ELISA dibaca dengan ELISA reader pada  $\lambda=405$  nm.

### Imunohistokimia

Preparat ovarium dicelup dalam xilol sebanyak 2 kali, alkohol bertingkat (100%, 90%, 80%, 70%, 30%) dan aquades secara berurutan kemudian direndam dalam 3% hidrogen peroksida (dalam air bebas ion) selama 5-10 menit. Preparat direndam dalam 1% *bovine serum albumin* (atau 1% *normal goat serum*) dalam PBS selama 10-30 menit pada suhu ruang dan ditambahkan antibodi primer *Rat Anti Rabbit Anti-bZP3* selama 1 jam pada suhu ruang. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit pada setiap tahapan.

Preparat ditambahkan antibodi sekunder *Anti-Rat IgG Biotin Labelled* selama 1 jam pada suhu ruang kemudian ditambahkan SA-HRP (*Strept Avidin-Horseradish Peroxidase*) selama 30-60 menit pada suhu ruang. Preparat dicuci dalam PBS pH 7,4 selama 3 x 5 menit pada tiap tahap. Cromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) ditambahkan pada preparat selama 10-20 menit pada suhu ruang kemudian dicuci dalam aquades selama 3 x 5 menit dan dilakukan *counterstain* dengan hematoxilen.

### Analisis Data

Kespesifikan anti-*bZP3* dikonfirmasi melalui metode *western blot* dan *dot blot*. Antigen *bZP3* yang berikatan secara spesifik dengan ZP3 ditandai dengan terbentuknya pita berwarna biru pada membran nitroselulosa hasil *western blot*. Spesifitas anti-*bZP3* terhadap ZP3 dapat diketahui secara semi kuantitatif melalui metode *dot blot* menghasilkan totalan berwarna biru/ungu. Titer anti-*bZP3* yang semakin tinggi akan menghasilkan totalan dengan warna ungu yang semakin gelap. Titer anti-*bZP3* diukur dengan menggunakan metode ELISA melalui *optical density* (OD) pada panjang gelombang 405 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

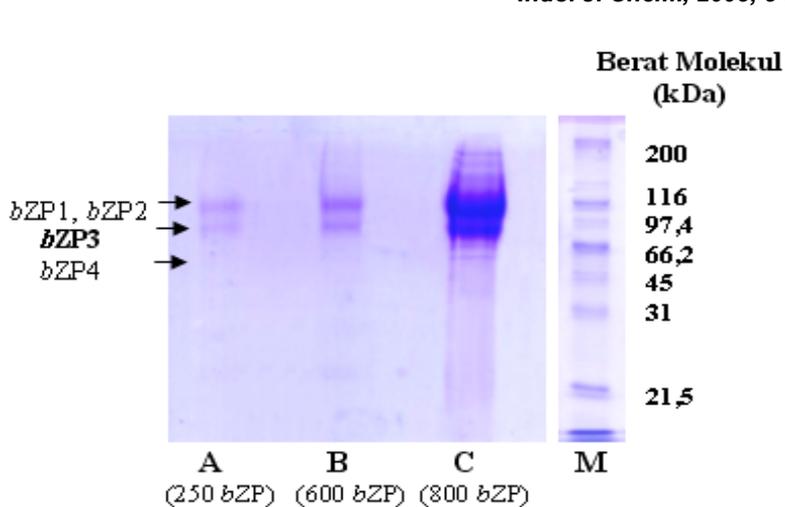
Zona pellusida sapi didapatkan melalui pemecahan oosit sapi dengan metode mekanis menggunakan pipet pasteur termodifikasi. *Bovine ZP* dapat diklasifikasikan dalam *bZP1*, *bZP2*, *bZP3* dan *bZP4* yang masing-masing memiliki berat molekul 110 kDa, 80 kDa, dan 54 kDa (Gambar 1). *Bovine ZP1* (*bZP1*) dan *bZP2* terdapat dalam satu *band*. Menurut penelitian Sumitro dan Aulanni'am [5], *bZP1* dan *bZP2* dapat dipisahkan melalui elektroforesis dua dimensi karena pada elektroforesis SDS-PAGE, *bZP1* dan *bZP2* bermigrasi bersama-sama sehingga menimbulkan pita elektroforesis yang sama.

Kadar protein *bZP3* telah diukur dalam penelitian Sumitro dan Aulanni'am [3] yaitu sebesar  $1,28 \pm 0,08$   $\mu\text{g}/\text{bZP}$ . Sampel C (Gambar 1) menunjukkan pemisahan *bZP3* dari 800 *bZP* terhadap fraksi penyusun *bZP* lainnya yang akan dilarutkan dalam 600  $\mu\text{L}$  Tris-HCl buffer. Kadar protein *bZP3* dari hasil elektroforesis 800 *bZP* ini telah memenuhi kadar minimum protein *bZP3* sebagai antigen yang dapat menimbulkan reaksi imun yaitu diatas 300  $\mu\text{g}$  / 200 $\mu\text{L}$  pelarutnya. Aktivitas biologik dari glikoprotein terletak pada komponen polipeptidanya.

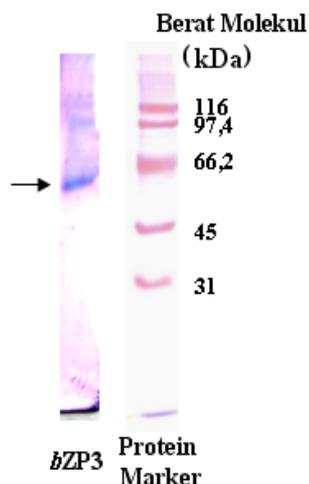
Hasil *western blotting* (Gambar 2) menunjukkan bahwa *rabbit anti-bZP3* yang dihasilkan pasca induksi *bZP3* dapat mengenali ZP3 sebagai antigennya. Hal ini menunjukkan bahwa dalam serum kelinci telah dihasilkan anti-*bZP3* sebagai respon imun terhadap *bZP3* yang diinduksikan ke kelinci. Penelitian Wardani [10], Aulanni'am and Susilawati [11], dan Kurniawati *et al.* [13] juga menunjukkan hasil serupa terhadap ZP3 tikus, kelinci dan kera. Anti-*bZP3* yang digunakan sebagai antibodi primer akan berikatan dengan pita ZP3 sebagai antigennya. *Anti Rabbit IgG AP-Conjugated* sebagai antibodi sekunder akan mengikat antibodi primer. Substrat *western blue* akan berikatan dengan enzim AP (Alkalin Phosphatase) pada antibodi sekunder akan menghasilkan pita yang berwarna biru gelap pada membran.

Pada hasil imunohistokimia didapatkan bahwa keberadaan anti-*bZP3* pada zona pellusida kelinci pasca induksi *bZP3* dapat dideteksi dengan menggunakan metode *indirect* imunohistokimia yang ditandai dengan warna coklat gelap pada zona pellusida (Gambar 3B-D). Warna coklat gelap menandakan visualisasi kromogen DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) pada kompleks ikatan *Strept Avidin Horseradish Peroxidase* - antibodi sekunder - antibodi primer *Rat Anti Rabbit Anti-bZP3* terhadap anti-*bZP3*.

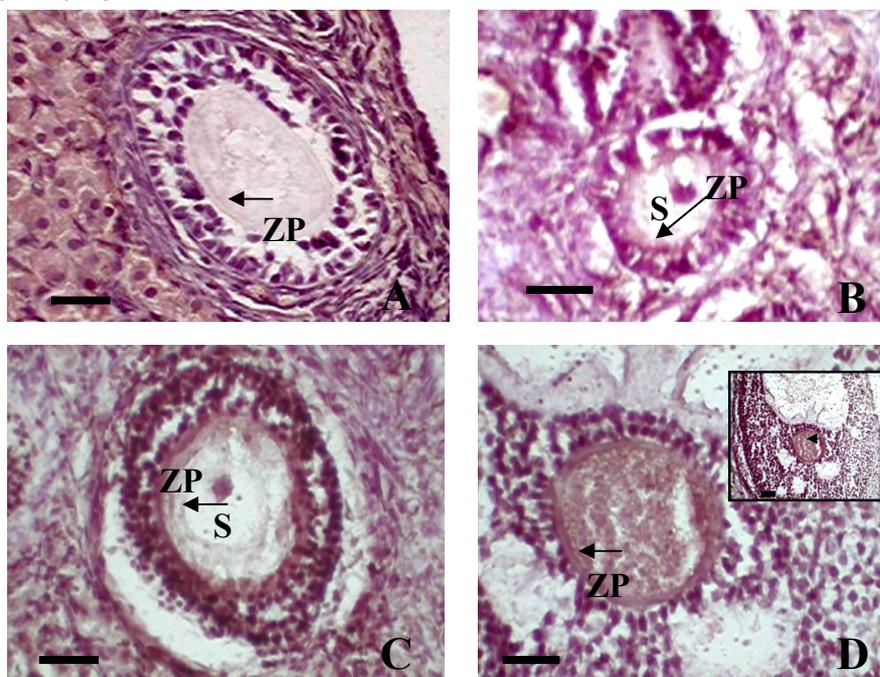
Pada hasil imunohistokimia (Gambar 3B-D) terlihat bahwa zona pellusida berwarna coklat tua, sedangkan sitoplasma tidak berwarna oleh kromogen DAB. Hal ini disebabkan karena anti-*bZP3* dalam serum kelinci yang ditimbulkan secara *in vivo* melalui imunisasi akan menuju ke sel targetnya dan berikatan dengan ZP3 yang merupakan protein integral pada oosit [14,15]. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Jewgenow dan Fickel [16] bahwa antiserum terhadap protein ZP bereaksi sangat spesifik dengan protein zona ekstraselular namun antigen ZP tidak dapat dideteksi secara intraselular dalam oosit.



**Gambar 1** Pemisahan fraksi bZP hasil elektroforesis pada berbagai jumlah crude bZP. Keterangan : A-C: Sampel dengan variasi jumlah bZP, M : Protein marker



**Gambar 2** Hasil Western Blotting antigen bZP3 yang dikenali oleh antibodi pada serum kelinci pasca induksi bZP3 (ditunjukkan tanda panah).



**Gambar 3** Hasil imunohistokimia pada zona pellusida oosit pada berbagai tahap perkembangan folikel, yaitu folikel primer akhir (B), folikel sekunder (C), dan folikel de Graaf (D). Anti-bZP3 terwarnai coklat gelap ditunjukkan dengan tanda panah. Pada kontrol (A) tidak didapati anti-bZP3 (Bar = 25 μm). Keterangan : ZP : Zona Pelusida, S : Sitoplasma.

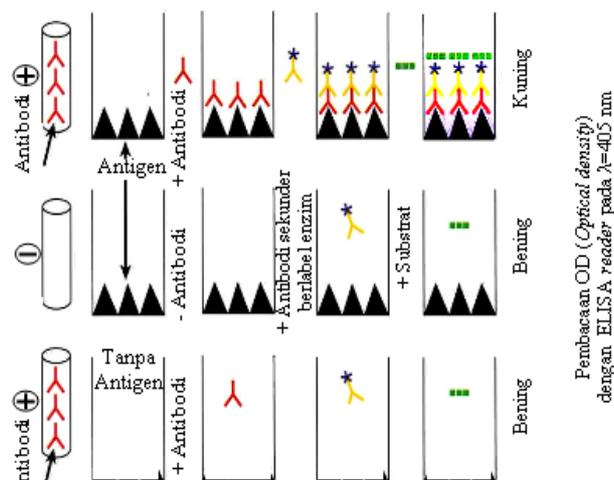
Metode	Antigen / Antibodi primer	Pasca induksi bZP3 (hari ke-)			
		0	24	31	48
Dot blotting	1/20				
	1/50				
ELISA (OD 405 nm)		0,032	0,193	0,215	0,200

**Gambar 4** Spesivitas anti-bZP3 terhadap bZP3 kuantitatif melalui metode dot blotting dan ELISA

Ikatan yang terjadi antara ZP3 pada zona pellusida kelinci dengan anti-*bZP3* sebagai respon dari induksi *bZP3* akan dikenali oleh antibodi primer *Anti Rabbit anti-bZP3* yang diproduksi pada tikus (*Rattus novergicus*). Antibodi primer ini akan berikatan dengan anti-*bZP3*. *Anti Rat IgG* berlabel Biotin sebagai antibodi sekunder dapat mengenali antibodi primer dengan spesifik. Metode yang digunakan pada imunohistokimia ini menggunakan kespesifikan ikatan antara molekul avidin dan biotin. Biotin pada antibodi sekunder akan langsung berikatan dengan avidin pada SA-HRP membentuk kompleks avidin-biotin melalui molekul avidin. Bagian yang terwarnai oleh imunohistokimia adalah zona pellusida yang merupakan protein integral pada membran oosit, sehingga digunakan hematoksilin sebagai *counterstain*.

Anti-*bZP3* yang dapat berikatan dengan ZP3 kelinci menunjukkan bahwa protein zona pellusida merupakan protein yang terkonservasi pada sapi maupun kelinci. Ikatan yang terjadi antara anti-*bZP3* dan ZP3 kelinci dapat diamati pada oosit dalam beberapa fase perkembangan folikuler sejak terbentuknya zona pellusida (Gambar 3). Warna coklat gelap pada zona pellusida yang menunjukkan ikatan anti-*bZP3* - ZP3 terdapat pada oosit yang berada pada tahap folikel primer akhir (Gambar 3B) hingga tahap folikel de Graaf (Gambar 3D). Hal ini menunjukkan bahwa anti-*bZP3* dapat mengenali ZP3 sejak terbentuknya zona pellusida oosit pada fase folikel primer akhir. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian pada mencit [17] dan kera marmoset [18] yang diimunisasi *human ZP3* rekombinan [19]. Antibodi dari hewan tersebut terlokalisasi pada zona pellusida oosit dari folikel yang sedang berkembang hingga ovum yang terovulasi [20]. Penelitian Carino *et al.* [1], Epifano *et al.* [3], Shabanowitz and O'Rand [7], dan Qi *et al.* [21] menyimpulkan bahwa zona pellusida yang melingkupi oosit mamalia terbentuk sejak fase folikel primer dan zona pellusida tidak mengalami perubahan yang signifikan selama perkembangan ovulasi.

Spesifitas dari anti-*bZP3* terhadap ZP3 dikonfirmasi secara semi kuantitatif melalui metode *dot blotting* (Gambar 4). Serum kelinci pasca induksi *bZP3* digunakan sebagai antibodi primer untuk mengenali ZP3 sebagai antigennya. Hasil *dot blotting* menunjukkan kespesifikan ikatan antara serum kelinci yang mengandung anti-*bZP3* terhadap ZP3 yang ditandai dengan terbentuknya totolan berwarna ungu gelap pasca induksi *bZP3*, sedangkan pada serum pre-imun (hari ke-0) tidak terbentuk.



**Gambar 5** Skema pengikatan antibodi pada metode ELISA [22]

Hasil *dot blotting* secara semi kuantitatif dapat menunjukkan bahwa anti-*bZP3* meningkat pada hari ke-24 dan ke-31 dan masih terdapat hingga hari ke-48. Hal ini ditandai dengan perubahan warna ungu gelap pada totolan yang terjadi dari hasil *dot blotting* (Gambar 5). Anti-*bZP3* telah terbentuk pada hari ke-24 pasca induksi *bZP3*, yaitu 10 hari setelah booster 1. Serum pada hari ke-31 menunjukkan warna ungu yang sangat gelap mengindikasikan kadar anti-*bZP3* yang tertinggi dibandingkan hari ke-24 dan 48, sedangkan pada hari ke-48 memiliki kadar anti-*bZP3* yang hampir sama dengan pada hari ke-31 ditandai dengan sedikit perubahan warna ungu gelap pada totolan.

Pengujian dengan metode ELISA dapat menunjukkan titer antibodi yang dihasilkan dari induksi *bZP3* secara kuantitatif. Konfirmasi melalui metode ELISA terhadap hasil *dot blot* menunjukkan titer *bZP3* yang dapat diamati secara kuantitatif (Gambar 8). Berdasarkan hasil pembacaan dengan metode ELISA, terjadi peningkatan titer yang ditandai melalui pembacaan OD<sub>405</sub>. Pada hari ke-31 menghasilkan warna ungu yang paling gelap pada metode *dot blotting* dan nilai OD<sub>405</sub> tertinggi pada metode ELISA yang menandakan dalam serum kelinci telah mengandung titer anti-*bZP3* yang tertinggi, yaitu 0,215. Serum pada hari ke-48 memiliki titer anti-*bZP3* yang lebih rendah daripada titer pada hari ke-31.

Penurunan titer ini disebabkan karena anti-*bZP3* yang terdapat dalam plasma darah telah menuju ke target sel yaitu oosit dan berikatan dengan zona pellusida 3 kelinci. Dari hasil pengukuran tersebut dapat diketahui bahwa pada saat pembedahan, kelinci memiliki titer anti-*bZP3* yang tinggi yaitu 0,200.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa anti-bZP3 berikatan secara spesifik dengan zona pellusida 3 ditandai dengan perubahan warna ungu gelap pada totalan yang terjadi dari hasil *dot blotting*. Anti-bZP3 meningkat pada hari ke-24 dan ke-31 dan masih terdapat hingga hari ke-48. Pengukuran dengan metode ELISA menunjukkan peningkatan titer pada OD<sub>405</sub>. Titer tertinggi didapat pada hari ke-31 pasca imunisasi. Anti-bZP3 pada zona pellusida oosit kelinci dapat dideteksi pada berbagai fase perkembangan zona pellusida yaitu pada oosit primer akhir hingga oosit pada fase folikel de Graaf.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Prof. Sutiman B. Sumitro sebagai ketua tim peneliti imunokontrasepsi berbasis zona pellusida 3 Universitas Brawijaya yang telah melibatkan penulis dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Carino, C., Diaz, L. and Mendez, I., 2001, *La Revista de Investigation Clinica* 53 (2), 174-180
2. Greenhouse, S., Philip, E., Castle and Dena, J., 1999, *Hum. Reprod.*, 14(31), 593-600
3. Epifano, O., Liang, L.F., Familiar, M., Moos, M.C. and Dean, J., 1995, *Development.*, 121, 1947 - 1956
4. Prasad, S.V., Skinner, S.M., Carino, C., Wang, N., Cartwright, J. and Dunbar, B.S., 2000, *Cell Tissue Organs.* 166 (2) (*Abstr.*)
5. Sumitro, S.B. and Aulanni'am, 2001, *Reprotech*, 1(1), 51-53
6. Bleil, J.D., Wassarman, P.M., 1986, *J. Cell. Biol.*, 102, 1363-1371
7. Shabanowitz, R.B. and O'Rand, M.G., 1988, *J. Reprod. Fert.*, 82, 151-161
8. Yonezawa, N., Fukui, N., Kuno, M., Shinoda, M., Goko, S., Mitsui, S. and Nakano, M., 2001, *Eur. J. Biochem.*, 268, 3587-3594
9. Lou, Y., Ang, J., Thai, H., McElveen, F. and Tung, K.S.K., 1995, *J. Immunol.* 155 : 2715-2720
10. Wardani, R.N. 2002, *Profil Titer Anti-bZP3 Hasil Induksi bZP3 Pada Tikus Wistar Jantan*, Skripsi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang
11. Aulanni'am and Susilawati, T., 2003, *Proc. Nat. Conf. Chem.*, 306-312
12. Goer, J., 1993, *Immunochemical Techniques Laboratory Manual*, Academic Press, Harcourt Brace Javanovich Publisher, San Diego, California
13. Kurniawati, M., Widodo, E., Sumitro, S.B. and Aulanni'am, 2004, *Basic Science I (Proceed.)*
14. Browder, L. and Iten, L., 1998, *Dynamic Development*, 72, 146-153
15. Hinsch, E., Oehninger, S., Schill, W. and Hinsch, K., 1999, *Hum. Reprod.*, 14(2), 419-428
16. Jewgenow, K. and Fickel, J., 1999, *Biol. Reprod.*, 60, 522-526
17. Rankin, T.L., Tong, Z., Castle, P.E., Lee, E., Gore-Langton, R., Nelson, L.M. and Dean, J., 1998, *Development*, 125, 2415-2424
18. Kerr, L.E., Paterson, M. and Aitken, R.J., 1998, *J. Reprod. Immunol.*, 40, 103-118
19. Henderson, C.J., Hulme, M.J. and Aitken, R.J., 1988, *J. Reprod. Fert.*, 83, 325-342
20. Koyama, K., Hasegawa, A. and Gupta, S.K., 2002, *Am. J. Reprod. Immunol.*, 47 (5), 303-310
21. Qi, H., William, Z. and Wassarman, P.M., 2002, *Mol. Biol. Cell.*, 13 (2), 530-541
22. Rossiter, C. and Hansen, D., 2003, *John's Diseases Diagnostic Tests : The ELISA*, College of Veterinary Medicine, Oregon State University