

# ANTIBODY OF GOAT ZONA PELLUCIDA-3 (gZP3) PROTEIN OF MICE (*Mus musculus*) BLOCK *IN VITRO* FERTILIZATION OF MICE AS AN ANIMAL MODEL

ANTIBODI PROTEIN ZONA PELUSIDA-3 KAMBING (gZP3) ASAL MENCIT  
(*Mus musculus*) MENCEGAH FERTILISASI *IN VITRO* OOSIT MENCIT  
SEBAGAI HEWAN MODEL

Imam Mustofa<sup>1</sup>, Laba Mahaputra<sup>1</sup>, Yoes Prijatna Dachlan<sup>2</sup>, Fedik Abdul Rantam<sup>3</sup>, Suwarno<sup>3</sup>, Widjiati<sup>4</sup>, and  
Aucky Hinting<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Reproduction Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University,

<sup>2</sup>Tropical Disease Center Airlangga University,

<sup>3</sup>Department of Veterinary Microbiology Faculty of Veterinary Medicine Airlangga University,

<sup>4</sup>*In vitro* Fertilization Laboratory of Dr. Soetomo Hospital/Faculty of Medicine Airlangga University,

<sup>5</sup>Department of Anatomy (Embryology) Veterinary Faculty of Veterinary Medicine

Airlangga University Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo, Surabaya-60115

Tel. 031-5992377, Fax.031-5993015

e-mail : [mustof@unair.ac.id](mailto:mustof@unair.ac.id)

## ABSTRACT

The researches of immunocontraception have done in ZP3 of several species, but have not been done in ZP3 of goat. In preliminary study, gZP3 protein was effectively prohibited of graviditation of mice. The aim of this study was to prove the potency of gZP3 protein to prohibit *in vitro* fertilization of mice as an animal model. Antibody of gZP3 produced on mice. Immunized mice serum was analyzed using Elisa and Dot blotting method. Antibody of gZP3 supplemented into M-16 media for oocyte incubation, continued with *in vitro* fertilization. The result showed that antibody titer of immunized mice serum was higher ( $p < 0.05$ ) compared to the titer of serum before immunization. Dot blotting analysis showed that antibody of the immunized mice could recognize gZP3 protein. Serum of immunized mice, which was supplemented in the fertilization media of mice oocyte *in vitro*, resulted in blocking of fertilization ( $p < 0,05$ ). It was concluded that gZP3 protein was effective as immunocontraceptive substance on mice as an animal model.

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

## ABSTRAK

Penelitian tentang imunokontrasepsi telah dilakukan pada ZP3 sejumlah spesies, namun penelitian menggunakan ZP3 kambing belum pernah dilakukan. Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa protein gZP3 efektif menghambat kebuntingan pada mencit. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan potensi protein gZP3 menghambat fertilisasi *in vitro* pada mencit sebagai hewan model. Antibodi gZP3 diproduksi pada mencit. Antibodi gZP3 disuplementasikan ke dalam media M-16 untuk inkubasi oosit, dilanjutkan dengan fertilisasi *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi mencit setelah imunisasi lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dibandingkan titer antibodi sebelum imunisasi. Analisis Dot blot menunjukkan bahwa antibodi asal serum mencit setelah imunisasi dapat mengenali protein gZP3. Serum asal mencit setelah imunisasi yang disuplementasikan ke dalam media fertilisasi oosit mencit secara *in vitro* dapat menghambat fertilisasi ( $p < 0,05$ ). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa protein gZP3 efektif sebagai bahan imunokontraseptif pada mencit sebagai hewan model.

**Kata-kata kunci:** zona pelusida-3 kambing, mencit, fertilisasi *in vitro*.

## PENDAHULUAN

Dalam rangka menambah ragam pilihan cara berkontrasepsi, dilakukan penelitian tentang imunokontrasepsi. Dengan imunokontrasepsi tubuh aseptor menghasilkan antibodi yang berperan mencegah pengenalan antara spermatozoa dengan oosit, sehingga pembuahan dapat dicegah. Bahan imunokontrasepsi yang potensial adalah zona pelusida-3 (ZP3), sebab ZP3 merupakan protein reseptor pengenalan oosit oleh spermatozoa (McCartney dan Mate, 1999; Sumitro dan Aulanni'am, 2001; Alberts, 2002).

Zona pelusida beberapa spesies yang telah diteliti adalah zona pelusida mencit (*Mus musculus*), manusia (*Homo sapiens*), kelinci (*Oryctolagus cuniculus*), Tikus (*Rattus norvegicus*), kera Bonnet (*Macaca radiata*) (Rankin dan Dean, 2000), babi (*Sus scrofa*), serta sapi (*Bos taurus*) (Sumitro dan Aulanni'am, 2001). Namun sampai saat ini belum ada hasil akhir yang siap diterapkan pada masyarakat, karena masih ditemukannya efek samping dalam pengujian menggunakan hewan coba. Efek samping terjadi pada pemakaian ZP3 sapi atau babi (Hasegawa *et al.*, 2002), berupa gangguan folikulogenesis dan penekanan *primordial follicle pool* (Paterson *et al.*, 1999). Kelainan ovarium tersebut menyebabkan perubahan profil hormon estrogen maupun progesteron, yang selanjutnya menimbulkan perubahan siklus birahi, dan percepatan penurunan jumlah folikel primordial secara irreversibel. Pada wanita, penurunan jumlah folikel primordial yang bersifat irreversibel akan menyebabkan menopause dini (Paterson *et al.*, 2002). Oleh karena itu perlu dilakukan eksplorasi protein ZP3 pada berbagai spesies untuk mendapatkan bahan imunokontrasepsi yang ideal.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa imunisasi gZP3 pada hewan coba mencit tidak menimbulkan perubahan siklus birahi (Mulyati *et al.*, 2003), efektif mencegah kebuntingan (Mustofa *et al.*, 2004b), tanpa perubahan histologis ovarium (Mustofa, 2005). Penelitian ini bertujuan menguji potensi

imunokontraseptif antibodi gZP3 pada fertilisasi *in vitro* oosit mencit sebagai model.

## MATERI DAN METODE

Ovarium kambing diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Pegirian, Surabaya. Folikel-folikel pada ovarium diaspirasi menggunakan *disposable syringe* berisi *phosphate buffer saline* (PBS). Sel-sel kumulus dihilangkan, kemudian zona pelusida dipecah dengan dua jarum tuberkulin dalam pengamatan mikroskop *disecting* untuk mengeluarkan vitelusnya. Zona pelusida dicuci tiga kali dalam PBS dan difraksinasi dengan *Ultrasonic Homogenizer*. Elektroforesis dengan *sodium dodecil sulphuric acid - polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) 12 % dilanjutkan dengan isolasi protein gZP3 (Mustofa *et al.*, 2004a).

Sepuluh mencit betina diimunisasi menggunakan 40 µg protein gZP3 dalam *Freund adjuvant* dengan dua kali *booster* interval 14 hari. Contoh darah diambil sebelum imunisasi dan tujuh hari setelah *booster* terakhir. Analisis titer antibodi serum dilakukan dengan Elisa. Uji *Dot blot* dilakukan dengan metode De Maio (1994). Protein gZP3 dibuat dengan konsentrasi 0,15, 0,12, 0,09, dan 0,06 µg/2 µL, sedangkan antibodi primer (serum mencit perlakuan) diencerkan 1/25 dan 1/50. Antibodi sekunder menggunakan *conjugate anti mouse IgG* terlabel *Alkaline Phosphatase* dengan pewarnaan *western blue*.

Mencit (*Mus musculus*) betina 10 ekor disuperovulasi dengan penyuntikan *pregnant mare serum gonadotropin* (PMSG), dan *human chorionic gonadotropin* (hCG) 5 IU. Selanjutnya mencit betina dikumpulkan dengan mencit pejantan yang telah divasektomi selama satu malam untuk menggertak ovulasi. Pengambilan kantung oosit dari oviduk dilakukan 17 jam kemudian. Sejumlah oosit dalam kantung oosit dibagi dua secara acak, sebagai kontrol dan perlakuan. Oosit kelompok kontrol diinkubasi dalam media M16 mengandung 10% serum sebelum imunisasi, sedangkan oosit kelompok perlakuan

diinkubasi dalam media M16 mengandung 10 % serum setelah imunisasi.

Spermatozoa mencit dengan konsentrasi spermatozoa  $2 \times 10^6$  sel/100  $\mu$ L diperoleh dengan cara pembilasan kauda epididimis mencit pejantan fertil. Kapasitas spermatozoa dilakukan pada inkubator 5% CO<sub>2</sub>, suhu 37°C selama satu jam. Suspensi spermatozoa ditambahkan dalam oosit, ditutup minyak parafin kemudian diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> untuk fertilisasi. Fertilisasi diketahui dengan mendeteksi terdegradasinya sel-sel kumulus dan keberadaan *polar body II* (PB II) 2 jam kemudian (Rankin *et al.*, 2001).

Data titer antibodi serum sebelum dan sesudah imunisasi dianalisis dengan uji t, sedangkan data angka kegagalan fertilisasi diuji dengan Chi-kuadrat. Analisis statistik dilakukan menggunakan program aplikasi statistik *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) for Windows pada tingkat kepercayaan 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Titer antibodi mencit sebelum imunisasi sebesar  $48 \pm 16,87$  dengan rentangan antara 40-80, naik ( $p < 0,05$ ) menjadi  $576 \pm 134,92$  atau dengan rentangan 320-640 setelah imunisasi (Tabel 1). Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam serum mencit betina kontrol yang pernah beranak terdapat klon IgG yang dikenali oleh epitop peptida pada gZP3. Menurut Zhu dan Naz (1999), terdapat homologi susunan asam amino ZP3 antar spesies, termasuk homologi susunan asam amino antara gZP3 dengan ZP3 mencit (*mice zona pellucida-3*, mZP3). Pada saat dilakukan imunisasi pada

mencit betina, beberapa epitop protein gZP3 yang homolog dengan protein epitop mZP3 berinteraksi secara langsung dengan beberapa klon IgG dan dengan sel-sel memori. Sel memori sensitif terhadap rangsangan oleh imunogen yang sama, sehingga sel-sel memori berproliferasi secara cepat menjadi sel plasma penghasil antibodi. Menurut Goldsby *et al.* (2000), respon imun yang terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas yang tinggi. Titer antibodi gZP3 serum mencit setelah imunisasi lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dibandingkan sebelum imunisasi. Pada respon imun sekunder periode laten lebih pendek, sintesis antibodi lebih cepat, puncak titer antibodi bertahan lebih lama, daya afinitas antibodi lebih tinggi, dan lebih banyak terdapat sel memori (Goldsby *et al.*, 2000 ; Abbas *et al.*, 2003).

Uji *Dot blot* protein gZP3 terhadap serum hasil imunisasi mencit dengan gZP3 menghasilkan gradasi warna dengan intensitas yang tajam. Antibodi gZP3 asal serum mencit sebagai perlakuan (sub kolom P) secara spesifik dapat mengenali protein gZP3. Pada kontrol (sub kolom K) tidak menunjukkan adanya pengenalan antigen-antibodi (Gambar 1). Hal tersebut menunjukkan bahwa antibodi yang terbentuk pada serum mencit hasil imunisasi dengan protein gZP3 adalah benar-benar antibodi gZP3. Menurut Rantam (2003) antibodi poliklonal yang mempunyai afinitas, aviditas dan spesifisitas yang tinggi terhadap antigen, menghasilkan gradasi warna noda yang tajam pada *Dot blot*.

Dua dari 10 mencit yang disuperovulasi dua diantaranya tidak menghasilkan oosit,

Tabel 1. Titer antibodi serum mencit (*Mus musculus*) sebelum dan setelah imunisasi dengan zona pelusida 3 (ZP3) kambing.

Waktu	Rentangan	Rerata $\pm$ Simpangan Baku
Sebelum Imunisasi	40 – 80	$48 \pm 16,87^a$
Setelah Imunisasi	320 – 640	$576 \pm 134,92^b$

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

	Serum : 1/25		Serum : 1/50	
	P	K	P	K
0,15 µg gZP3	●		●	
0,12 µg gZP3	●		●	
0,09 µg gZP3	●		●	
0,12 µg gZP3	●		●	

Gambar 1. Hasil Analisis Dot Blot Antibodi gZP3 (AbgZP3) Asal Mencit (*Mus musculus*) terhadap Protein gZP3. Keterangan : K : Kontrol, P : Perlakuan

sehingga tinggal delapan kantung oosit yang dipakai untuk delapan tetes fertilisasi sebagai ulangan. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 2. Pada kelompok kontrol (media fertilisasi mengandung 10% serum mencit sebelum diimunisasi dengan titer antibodi terendah, yaitu 40), terdiri dari 54 oosit, seluruhnya mengalami fertilisasi. Terjadinya fertilisasi ditandai dengan terdegradasinya sel-sel kumulus dan terbentuknya *polar body II* pada sigot sebagaimana terlihat pada Gambar 2.c. Pada kelompok perlakuan (media fertilisasi *in vitro* disuplementasi dengan 10% serum mencit setelah imunisasi, dengan titer antibodi gZP3 640), menghambat fertilisasi seluruh oosit pada delapan tetes fertilisasi dengan jumlah total oosit sebanyak 49 buah. Kegagalan fertilisasi

tersebut ditandai dengan kompleks – oosit – kumulus yang tetap utuh (Gambar 2.d).

Apabila suatu bahan imunokontrasepsi diaplikasikan pada wanita, maka antibodi yang terbentuk pada wanita tersebut memblok seluruh reseptor fertilisasi (ZP3) pada oosit yang diovulasikan, sehingga oosit gagal dikenali oleh spermatozoa. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan dengan pemodelan, penerapan bahan imunokontrasepsi gZP3 pada wanita sebagaimana gambaran di atas. Protein gZP3 diimunisasikan pada mencit, selanjutnya antibodi gZP3 yang dihasilkan diuji dengan teknik fertilisasi *in vitro* juga pada oosit mencit.

Pengujian kinerja antibodi dalam penelitian imunokontrasepsi dengan teknik fertilisasi *in vitro*, apabila target

Tabel 2. Hasil fertilisasi *in vitro* oosit mencit (*Mus musculus*) dengan inkubasi dalam *pre immune serum* (Kontrol) dan *post immune serum* (Perlakuan)

Kelompok	Jumlah Tetes Fertilisasi	Jumlah Oosit	Fertilisasi	Gagal Fertilisasi
Kontrol	8	54	54	0
Perlakuan	8	49	0	49

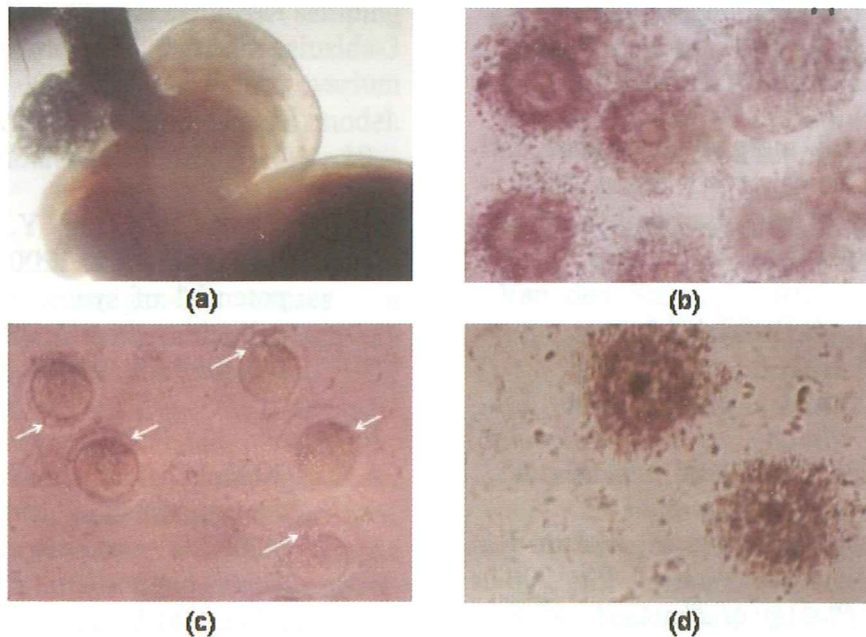
Keterangan : terdapat perbedaan nyata ( $p < 0,05$ ) antar perlakuan

imunokontrasepsi adalah oosit, maka oosit diinkubasi dalam media yang disuplementasi dengan antibodi, sebelum diinseminasi *in vitro* (Rankin *et al.*, 2001 ; Hasegawa *et al.*, 2002 ; Hardy *et al.*, 2003). Suplementasi media fertilisasi *in vitro* dengan 10 % serum dengan titer antibodi gZP3 640 terbukti mencegah fertilisasi. Hasil tersebut identik dengan laporan Naz dan Zhu (1998) tentang pengujian antibodi terhadap protein FA-1 (*fertilizing antigen-1*, suatu protein membran plasma spermatozoa) murine. Antibodi FA-1 murine diinduksi pada mencit, selanjutnya diuji dengan teknik fertilisasi *in vitro* pada mencit. Pada kelompok perlakuan ternyata tidak menghasilkan fertilisasi.

Menurut Barber dan Fayer-Hosken (2000), hewan yang diimunisasi dengan protein zona pelusida, level IgG dalam sistem sirkulasi berkorelasi positif dengan infertilitas yang terjadi. IgG akan terikat secara sterik pada glikoprotein ZP3 oosit. Besarnya angka kegagalan fertilisasi tergantung pada seberapa

lengkap antibodi menutup reseptor fertilisasi pada zona pelusida. Penelitian *in vivo* maupun *in vitro* menunjukkan adanya infertilitas yang besarnya tergantung dosis. Imunisasi mencit dengan protein gZP3, membuktikan bahwa dosis imunogen yang lebih tinggi, menghasilkan titer antibodi serum hewan coba lebih tinggi dan menyebabkan angka kegagalan kebuntingan yang lebih tinggi (Mustofa *et al.*, 2004b). Jewgenow *et al.* (2000) membuktikan bahwa lebih tinggi kadar serum anti ZP3 yang disuplementasikan pada media fertilisasi *in vitro* oosit dengan spermatozoa kucing, angka kegagalan fertilisasi lebih tinggi. Hal ini disebabkan pada zona pelusida terdapat *multiple reseptor* (ZP3) untuk pengenalan terhadap spermatozoa (Thaler dan Cardullo, 1996).

Pada proses fertilisasi, saat spermatozoa terikat pada zona pelusida, maka  $\beta 1,4$  – *galactosyltransferase* (Galtase), sebagai ligan pada sel spermatozoa terikat pada glikan Gal –  $\beta(1,3)$  – GalNAc, reseptor ovum pada ZP3



Gambar 2. Hasil fertilisasi *in vitro* oosit mencit (*Mus musculus*) : (a), Kantung oosit, pembesaran 40 x (b), Komplek oosit – kumulus, (c) Oosit kelompok kontrol mengalami fertilisasi, tanda panah : Polar Body II ; dan (d) Oosit kelompok perlakuan tidak mengalami fertilisasi, pembesaran 100 x. Pemeriksaan dengan Mikroskop Cahaya Meiji CE Binocular

(Bazer *et al.*, 2000 ; Van den Steen *et al.*, 1998). Ikatan tersebut akan menginduksi reaksi akrosom dan fertilisasi selengkapnya (Miller *et al.*, 2002). Kegagalan fertilisasi akibat pemakaian imunokontrasepsi ZP3 adalah karena tertutupnya secara sterik reseptor fertilisasi oleh antibodi ZP3, sehingga menghalangi terikatnya spermatozoa (Hasegawa *et al.*, 2000). Akibatnya reaksi akrosom gagal dan spermatozoa tidak mampu melanjutkan kesinambungan proses fertilisasi.

Berdasarkan hasil penelitian ini, disimpulkan bahwa protein gZP3 imunogenik pada mencit betina, menghasilkan antibodi spesifik yang dapat dikenali oleh protein gZP3 pada analisis *Dot blot*. Uji imunokontraseptif pada mencit sebagai hewan model menunjukkan bahwa antibodi gZP3 menghambat fertilisasi oosit mencit secara *in vitro*. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menemukan susunan asam amino gZP3 yang homolog dengan susunan asam amino ZP3 manusia dan mengujinya dengan teknik *Human sperm-oocyte binding assay* atau *Human Hemi zona assay*.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari Penelitian Hibah Bersaing XI tahun 2003 – 2005. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Ditbinlitabmas Ditjen Dikti, Depdiknas.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pober J.S., 2003. *Cellular and Molecular Immunology*. 5<sup>th</sup> Ed. WB Saunders.
- Alberts, B., Johnson A., Lewis, J., Martin, R., Roberts, K. and Walter, P., 2002. *Molecular Biology of The Cell*. 4<sup>th</sup> Ed. Garland Science, New York.
- Barber, M.R. and Fayrer-Hosken, A., 2000. Possible mechanism of mammalian immunoneutralization. *J. Immunol Reprod.* 46 : 103-124.
- Bazer, F.W., Geisert, R.D. and Zavy M.T., 2000. Fertilization, cleavage and implantation. In : Hafez, E.S.E. (Ed). *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> Ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- De Maio, A., 1994. Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membrane, In : Dunbar BS (Ed), *Protein blotting, A Practical Approach*. Oxford University Press, pp : 11-29.
- Goldsby, R.A., Kindt, T.J. and Osborne, B.A., 2000. *Kuby immunology*. 4<sup>th</sup> Ed. New York : W.H. Freeman and company.
- Hardy, C.M., ten Have, J.F., Pekin J., Beaton, S., Jackson, R.J. and Clydesdale, G., 2003. Contraceptive responses of mice immunized with purified recombinant mouse zona pellucida subunit 3 (mZP3) proteins. *Reproduction*.126(1):49-59.
- Hasegawa, A., Tsubamoto, H., Hamada, Y. and Koyama, K., 2000. Blocking effect of antisera to recombinant zona pellucida proteins (r-ZPA) on *in vitro* fertilization. *Am. J. Reprod. Immunol.* 44(1):59-64.
- Hasegawa, A., Hamada, Y., Shigeta, M. and Koyama, K., 2002. Contraceptive potential of synthetic peptides of zona pellucida protein (ZPA). *J. Reprod. Immunol* 53 : 91-98.
- Jewgenow, K., Rohleder, M. and Wegner, I., 2000. Differences between antigenic determinants of pig and cat zona pellucida proteins. *J. Reprod. and Fertil.* 119:15-23.
- McCartney, C.A. and Mate, K.E., 1999 Cloning and characterisation of a zona pellucida 3 cDNA from a marsupial, the brushtail possum *Trichosurus vulpecula*. *Zygote*. 7(1):1-9.

- Miller, D.J., Shi, X. and Burkin, H., 2002. Molecular basis of mammalian gamete binding. *RPHR* 57 : 37-73.
- Mulyati, S., Mustofa, I. dan Utama, S., 2003. Pengaruh zona pelusida fraksi 3 (ZP3) kambing sebagai bahan antifertilitas terhadap siklus birahi mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan* 19(1) : 17-20.
- Mustofa, I., Mahapura, L., Rantam, F.A. dan Restiadi, T.I., 2004a. Isolasi zona pelusida-3 kambing dan identifikasi karakter reseptor fertilisasi dengan uji imunofluoresen. *Media Kedokteran Hewan* 20 (3) : 116 - 120.
- Mustofa, I., Mulyati, S. dan Mahaputra, L., 2004b. Pengaruh imunisasi dengan zona pelusida -3 kambing terhadap angka kebuntingan dan jumlah anak pada mencit (*Mus musculus*). *Media Kedokteran Hewan* 20 (1) : 22 - 25.
- Mustofa I., 2005. Identifikasi efek samping imunokontrasepsi zona pelusida-3 kambing pada histologis ovarium mencit (*Mus musculus*) sebagai model. *Media Kedokteran Hewan* 21 (1) : 19 - 22.
- Naz, R.K. and Zhu X., 1998. Recombinant fertilization antigen-1 causes a contraceptive effect in actively immunized mice. *Biol. Reprod.* 59 : 1095-1100.
- Paterson, M., Wilson, M.R., Jennings, Z.A., van Duin, M. and Aitken, R.J., 1999. Design and evaluation of a ZP3 peptide vaccine in a homologous primate model. *Mol. Hum. Reprod.* 5 (4) : 342-52.
- Paterson, M., Wilson, M.R., Jennings, Z.A. and Aitken R.J., 2002. The contraceptive potential of ZP3 and ZP3 peptides in a primate model. *J. Reprod. Immunol.* 53 : 99-107.
- Rankin, T. and Dean, J., 2000. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. *Rev. Reprod.* 5 : 114-121
- Rankin, T.L., O'Brien, M., Lee, E., Wigglesworth, K., Eppig, J. and Dean, J., 2001. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development* 128 : 1119-1126
- Rantam, F.A., 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Sumitro, S.B. and Aulanni'am., 2001. Zona pellucida 3 (ZP3) has proper biochemical properties to be considered as candidate antigen for immunocontraceptive vaccine. *Reprotech.* 1(1) 51-53.
- Thaler, C.D. and Cardullo, R.A., 1996. Distinct membrane fractions from mouse sperm bind different zona pellucida glycoproteins. *Biol. Reprod.* 66 : 65-69.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A. and Opdenakker, G., 1998. Concept and principles of O-linked glycosylation. *Biochem. Mol. Biol.* 33(3) : 151 - 208.
- Zhu, X. and Naz, R.K., 1999. Comparison of ZP3 protein sequence among vertebrate species : to obtain a consensus sequence for immunocontraception. *Frontiers in Bioscience* 4 : 212-225.