

THE IMPACT OF GIVING Mab bZP 3 TOWARD AMH EXPRESSION AND ANTRAL FOLLICLE COUNT IN MUS MUSCULUS

Milatun Khanifah¹, Sri Poeranto², Sutrisno³

¹ Muhammadiyah Health Science Institute of Pekajangan, Pekalongan, Indonesia
milatun_hanif@yahoo.co.id

² Departement of Parasitology Faculty of Medicine University of Brawijaya, Malang, Indonesia

³ Division of Fertility, Endocrinology and Reproduction, Departement of Obstetric and Gynecology, Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia
snospogk@gmail.com

ABSTARCT

Bovine zona pellucida 3 monoclonal antibodies (Mab bZP3) is one of materials under development as more effective, safe, and reversible contraceptive then the existing materials. How the action of Mab bZP3 in suppressing fertility and its effect to the folliculogenesis still need study. The objective of this study was to investigate the impact of Mab bZP3 towards Anti Mulleriane Hormone Expsression and Antral Follicle Count at different time. Mus Musculus Balb/c was used in this research as the animal models. The administration of 50µl Mab bZP3 with 50 µl adjuvant, AIOH₃, resulted in the reduction of AMH expression. In contrast, no increase in antral follicle count due to Mab bZP3 treatment. There was no significant evidence on discrepancy effect of Mab bZP3 to the reduction of AMH expression and increase of antral follicle count at different time. The administration Mab bZP3 directed to reduction of AMH expression, but no apparent elevation in antral follicle count. There was no significant discrepancy impact of Mab bZP3 toward the reduction of AMH expression and elevation in antral follicle count at different time.

Key Words: Mab bZP3, AMH expression, antral follicle count, different time

1. PENDAHULUAN

Penggunaan metode kontrasepsi merupakan upaya penting dalam pengendalian ledakan penduduk. Imunokontrasepsi merupakan salah satu upaya yang sedang dikembangkan sebagai kandidat bahan kontrasepsi yang lebih aman dan reversibel. Salah satu target dari imunokontrasepsi adalah Zona Pelusida 3 (ZP3), karena peran utamanya dalam fertilisasi sebagai reseptor utama spermatozoa¹ Sumitro, S.B., Aulanni'am, Soewart, S., Ciptadi, G., Widyarti, S., and Kurniawan, D. 2011. .

Penggunaan imunisasi aktif sebagai imunokontrasepsi telah dibuktikan oleh berbagai penelitian memiliki banyak

kelemahan. Hal tersebut menjadi salah satu sebab pengembangan imunisasi pasif lebih mendapat perhatian saat ini² Naz, R.K., and Rajesh, C., 2004..

Adanya antibodi ZP diduga mempengaruhi fungsi sel granulosa³ Koyama, K., and Hasegawa, A., 2006.. *Anti Mullerian Hormone* diproduksi oleh sel granulosa dan memiliki peran dalam menghambat rekrutmen dan seleksi folikel sehingga menentukan jumlah folikel yang berkembang menjadi folikel antral^{4,5} Gruijters, M.J., Visser, J.A., Durlinger, A.L. and Themmen, A.P., 2003, Visser, J.A., and Themmen, A.P., 2005.

Penelitian *in-vivo* mengenai pengaruh pemberian Mab-bZp3 terhadap *Anti Mullerian Hormone* (AMH) dan jumlah folikel antral

masih perlu dilakukan. Pentingnya penelitian tentang jumlah folikel antral dan AMH terkait dengan perannya dalam menentukan tingkat fertilitas seorang wanita, reversibilitas dan keamanan Mab bZP3.

2. KAJIAN LITERATUR DAN PENGEMBANGAN HIPOTESIS

Peluang pengembangan imunokontrasepsi -terutama pada wanita- semakin besar setelah dikenal adanya antibodi terhadap ZP sel telur, sebagai respon dari terpaparnya glikoprotein ZP yang mempunyai sifat antigenik dan potensial untuk dikembangkan sebagai calon vaksin kontrasepsi. Zona Pelusida sapi dipilih sebagai antigen karena berdasarkan hasil penelitian menunjukkan adanya *cross reaction* antibodi terhadap ZP sapi (anti-bZP3) di antara kelas mamalia yaitu mencit, tikus putih, kambing, dan sapi¹.

Eksresi spesifik AMH pada sel granulosa folikel yang sedang tumbuh yang tidak terseleksi, menjadikan AMH sebagai marker yang ideal untuk ukuran/jumlah kumpulan folikel ovarium. *Anti Mullerian Hormone* berperan sebagai marker untuk penilaian aspek kuantitatif cadangan ovarium/*ovarian reserves* dan juga disfungsi ovarium⁶. Pemeriksaan jumlah folikel antral merupakan salah satu metode untuk memperkirakan jumlah oosit yang sehat dalam ovarium pada masa reproduksi yang memiliki hubungan diagnostik yang penting dalam keluarga berencana⁷. Jumlah folikel antral menentukan jumlah oosit, yang secara klinis berhubungan dengan *outcome* berupa kehamilan atau kelahiran hidup, tergantung pada kualitas dan kuantitas oosit⁸. Terdapat korelasi yang kuat antara kadar AMH dengan jumlah folikel antral⁹.

Hambatan pertumbuhan dan diferensiasi sel granulosa mempengaruhi produksi AMH. Multiplikasi mRNA AMH paling tinggi pada sel granulosa dari folikel berlapis⁶. Ekspresi kadar AMH tertinggi ditemukan pada sel granulosa pada folikel pre antral besar dan folikel antral kecil¹⁰. Menurut¹¹ Salmon, *et al.* (2004) pada folikel ovarium, mRNA AMH diekspresikan pada sel granulosa dalam tahap folikel primer sampai pre ovulasi, tetapi menjadi menurun setelah pembentukan antrum¹¹.

Antibodi ZP memiliki efek yang merugikan terhadap proses folikulogenesis, oogenesis dan akhirnya berpengaruh pada fertilisasi. Hal ini karena antibodi ZP memiliki pengaruh langsung terhadap struktur ZP dan mungkin merusak perkembangan normal dari *gap junction* oosit-sel granulosa dan komunikasi *bidirectional* oosit-sel granulosa sehingga mengakibatkan atresia folikel, gangguan maturasi oosit, dan fertilisasi¹².

Hipotesis yang ditetapkan dalam penelitian ini adalah pemberian antibodi monoklonal bZP3 (Mab-bZP3) berpengaruh menurunkan ekspresi AMH di sel granulosa dan meningkatkan jumlah folikel antral ovarium.

3. METODE

Penelitian ini merupakan penelitian Eksperimen dengan *Nested Design* yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan mencit *Mus Musculus Balb/c* betina yang berusia 1-2 bulan, yang didapatkan dari Unit Pra-Klinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta berjumlah 36 ekor. Mencit dibagi menjadi enam kelompok yaitu 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok kontrol yang masing-masing dibedah pada hari ke-5, ke-10, dan ke-20.

Pemberian Imunisasi Pasive Mab bZP3

dan PBS

Pemberian Mab bZP3 dan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dilakukan pada fase estrus. Mencit perlakuan mendapat Mab bZP3 sebanyak 50 µl yang dicampur dengan 50µl adjuvan, sedangkan mencit kontrol mendapat 50µl PBS. Injeksi dilakukan secara Intra Muskuler.

Pembuatan preparat histopatologis

Pemotongan organ dilakukan setelah melewati proses fiksasi organ, dehidrasi, *clearing*, *impregnansi* dan *embedding*. Penyayatan organ dilakukan menggunakan *microtome* dengan ketebalan 4 µm.

Pengamatan Jumlah Folikel Antral

Identifikasi folikel dilakukan dengan pewarnaan Hematoksilin Eosin. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya. Sel folikel dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Ciri folikel antral adalah memiliki lebih dari satu lapis sel folikel berbentuk kubus (*single layer of columnar cells*) yang mengelilingi oosit primer, sel theca mulai berdiferensiasi menjadi sel theca interna dan eksterna, serta mulai terbentuknya *antrum folliculi* yang berisi *liquor folliculi*¹³.

Pengamatan Ekspresi AMH dengan imunohistokimia

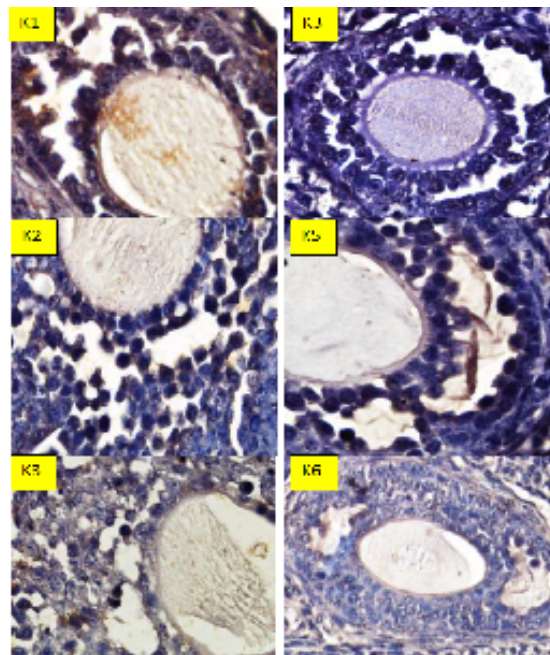
Imunostaining dengan metode imunohistokimia dilakukan pada sediaan preparat histopatologis. Antibodi primer yang digunakan adalah *Rabbit anti AMH polyclonal antibody* (biosUSA, bs4687R). Mayer digunakan sebagai cat pembanding. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya.

Data setiap sampel dinilai secara semikuantitatif menurut metode *Remmele* yang sudah dimodifikasi. Indeks skala *Remmele* (*Immuno Reactive Score/IRS*) merupakan hasil perkalian antara skor persentase sel immunoreaktif dengan skor intensitas warna pada sel immunoreaktif¹⁴.

Analisa Statistik

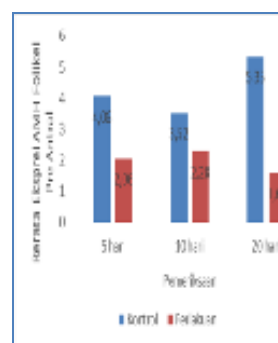
Hasil pemeriksaan ekspresi AMH dan jumlah folikel antral ditampilkan dalam bentuk $\text{mean} \pm \text{SD}$ dan dianalisa secara statistik menggunakan *Nested ANOVA*. *P value* kurang dari 0,005 dinyatakan tidak signifikan secara statistik.

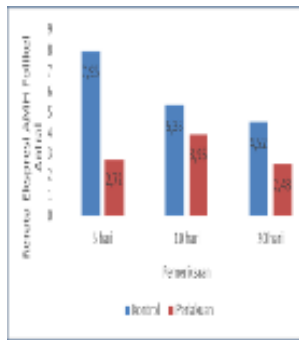
4. HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Perbandingan ekspresi AMH yang ditandai dengan warna coklat kromogen (panah) pada sel-sel granulos a folikel di antara perlakuan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa indeks IRS ekspresi AMH dari sel-sel granulos a folikel pada kelompok K1, K2 dan K3 lebih kuat dibandingkan dengan rerata skor dari kelompok K4, K5 dan K6 (*pewarnaan immuno histokimia, Pembesaran 1000x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel.*)

Perbandingan ekspresi AMH antara kelompok kontrol dan perlakuan ditampilkan pada histogram berikut:





Gambar 2. Perbandingan ekspresi AMH antar waktu Pengamatan.

Rerata ekspresi AMH secara deskriptif pada kelompok perlakuan lebih rendah dari pada kelompok kontrol.

Pada gambar 2 di atas, terlihat bahwa pada semua waktu pengamatan (5, 10, dan 20 hari), rerata ekspresi AMH pada kelompok perlakuan lebih rendah dari pada kelompok kontrol.

Tabel 1. Perbandingan Rerata Ekspresi AMH Antara Kontrol dan Perlakuan

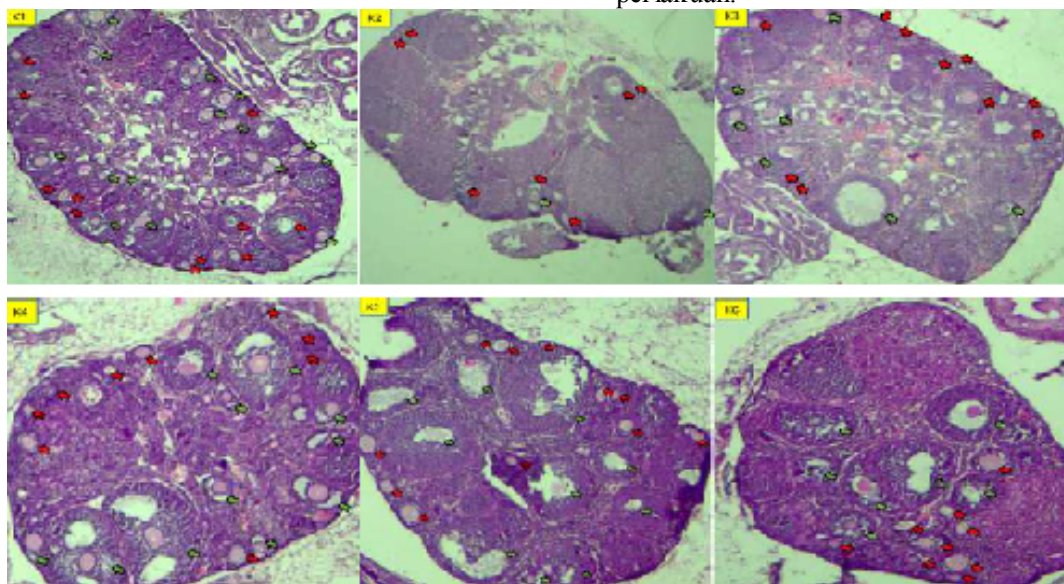
Antibodi	Mean ± SD	
	Ekspresi AMH Folikel Pre Antral	Ekspresi AMH Folikel Antral
Kontrol	4.31 ± 2.15 ^a	
Perlakuan	1.98 ± 2.06 ^b	
<i>p-value</i>	0.001	0.001

Tabel 1. menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi AMH antara kelompok kontrol dengan perlakuan.

Tabel 2. Perbandingan Ekspresi AMH Pada Berbagai waktu pengamatan

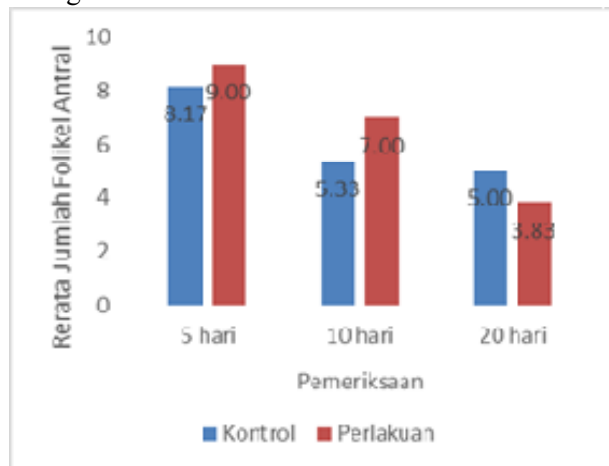
Antibodi	Penga- matan	Mean ± SD	
		Folikel Pre Antral	Ekspresi AMH Folikel Antral
Kontrol	Hari ke-5	4.06 ± 2.04	7.95 ± 1.47
	Hari ke-10	3.52 ± 0.72	5.33 ± 1.21
	Hari ke-20	5.35 ± 3	4.52 ± 1.9
Perlakuan	Hari ke-5	2.06 ± 1.09	2.72 ± 1.98
	Hari ke-10	2.28 ± 3.35	3.95 ± 4.14
	Hari ke-20	1.6 ± 1.29	2.48 ± 2.35
<i>p value</i>		.789	.316

Tabel 2. menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata ekspresi AMH baik secara keseluruhan (*p value* = 0.625) folikel pre antral (*p value* = 0.789) maupun folikel antral (*pvalue* = 0.316) antar waktu pengamatan antara kelompok kontrol dengan perlakuan maupun antar waktu pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.



Gambar 3. Sediaan preparat histopatologis ovarium dengan metode pewarnaan HE pada masing-masing kelompok penelitian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x. Anak panah menunjukkan folikel antral.

Perbandingan Rerata Jumlah Folikel Antral Pada masing-masing kelompok tampak pada histogram di bawah ini:



Gambar 4. Histogram rerata jumlah folikel antral.

Rerata jumlah folikel antral kelompok perlakuan lebih besar dibandingkan kelompok kontrol pada pengamatan hari ke-5 dan ke-10, namun pada pengamatan hari ke-20 jumlah folikel antral lebih besar pada kelompok kontrol.

Berdasarkan pada gambar 5.6 di atas, tampak bahwa pada waktu pengamatan hari ke-5 hari dan hari ke-10, jumlah folikel antral pada kelompok perlakuan lebih tinggi daripada kelompok kontrol. Sedangkan pada waktu pengamatan hari ke-20, rerata jumlah folikel antral pada kelompok perlakuan lebih rendah daripada kelompok kontrol.

Tabel 3. Perbandingan Rerata Jumlah Folikel Antral

Antibodi	Mean ± SD
	ah Folikel Antral
	6.17 ± 4.58
	6.61 ± 2.75
	0.443

Tabel 3. menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata jumlah folikel antral antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Tabel 4. Perbandingan Rerata Jumlah Folikel Antar Waktu Pengamatan

Antibodi	Waktu	Mean ± SD
----------	-------	-----------

	Pengamatan	Jumlah Folikel Antral
Kontrol	Hari ke-5	8.17 ± 5.08
	Hari ke-10	5.33 ± 5.43
	Hari ke-20	5.00 ± 2.97
Perlakuan	Hari ke-5	9.00 ± 2.10
	Hari ke-10	7.00 ± 1.10
	Hari ke-20	3.83 ± 1.94
p-value		0.051

Tabel 4. menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan rerata jumlah folikel antral antar waktu pengamatan antara kelompok kontrol dan perlakuan maupun antar waktu pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan (*p value* = 0.051)

Target imunokontrasepsi Mab bZP3 adalah ZP3, yang merupakan komponen penyusun Zona Pelusida¹. Pemberian antibodi ZP3 dan antibodi anti-ZP3 terbukti berpengaruh terhadap folikulogenesis^{3,12}.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Mab bZP3 berpengaruh terhadap penurunan ekspresi AMH pada folikel ovarium (*p-value* = 0,001). Penurunan ekspresi AMH pada kelompok perlakuan (pemberian Mab bZP3) diduga terjadi karena Mab b-ZP3 mampu berikatan dengan ZP3 mencit yang selanjutnya mengganggu struktur zona pelusida. Kerusakan stuktur zona pelusida akan mempengaruhi fungsi sel granulosa dalam mengekspresikan AMH.

Ikatan Mab bZP3 dengan ZP3 dapat terjadi karena ZP3 dapat dikenali oleh Fab dari Mab bZP3. Antibodi memiliki idiotope, yaitu epitope yang terdapat pada daerah variabel (Fab) dan merupakan bagian yang mampu mengenali makromolekul dan kimia kecil tertentu^{15,16}.

Adanya *conserved region* pada sekuen rantai polipeptida penyusun zona pelusida pada berbagai mamalia antibodi ZP3 yang dihasilkan dari satu mamalia dapat dikenali oleh mamalia lainnya¹⁷. Mab bZP3 telah terbukti memiliki

sifat interspesifik. Adanya kesamaan asam amino penyusun zona pelusida pada mamalia yang berbeda diduga menyebabkan Mab bZP3 mampu mengenali ZP3 dari spesies mamalia lainnya¹. Terdapat respon positif berupa warna biru pada uji *Dot Blot* pada pemeriksaan antibodi setelah mencit diinjeksi dengan Mab bZP3¹². Anti-bZP3 dalam serum kelinci yang ditimbulkan secara *in-vivo* melalui imunisasi dengan bZP3, terbukti menuju sel target dan berikatan dengan ZP3 yang merupakan protein integral pada oosit¹⁹. Akumulasi antibodi ZP3 pada folikel ovarium ditemukan pada mencit imunodefisiensi (*μMT mice*) yang dipapar dengan antibodi monoklonal rat ZP3²⁰. Ikatan antibodi Mab bZP3 dengan ZP3 mencit diduga dapat mempengaruhi struktur zona pelusida sebagai matriks yang berada antara oosit dan sel granulosa berupa pengerasan sebagai akibat aglutinasi.

Antibodi memiliki idiotope, yaitu epitope yang terdapat pada daerah variabel (Fab) dan merupakan bagian yang mampu mengenali makromolekul dan mikromolekul tertentu^{9,10}. Aglutinasi dapat terjadi sebagai akibat ikatan antigen antibodi, dengan antigen menempel pada permukaan partikel atau sel sebagai bagian integral^{16,21}.

Anti-ZP3 dalam serum mencit yang ditimbulkan secara *in-vivo* melalui proses imunisasi peptide imunogenik CP2 dan CP3, menyebabkan perubahan struktur zona pelusida terutama pada tahap awal pertumbuhan folikel antral. Kerusakan zona pelusida berupa pembentukan *gap junction* antara oosit dan sel granulosa lebih sedikit, filamen terdistribusi merata sepanjang zona pelusida, batas zona pelusida tidak jelas, dan terlihat banyak partikel menyerupai filamen pada ruang antara ZP dan sel granulosa²². Pemberian suatu antibodi dapat merangsang terbentuknya ant-antibodi¹⁶. Pemberian antibodi ZP menyebabkan efek secara langsung terhadap kerusakan glikoprotein ZP3, mencegah sintesa ZP2 secara normal dan berikutnya mempengaruhi pembentukan ZP, menjadi lebih tipis¹². Pemberian antibodi zona pelusida kemungkinan dapat merusak perkembangan normal dari *gap junction* oosit-sel granulosa dan komunikasi

bidirectional oosit-sel granulosa yang penting untuk folikulogenesis dan oogenesis

Hubungan antara oosit dan sel granulosa merupakan kontrol yang paling signifikan dalam proses folikulogenesis. Berbagai molekul pertumbuhan yang dibutuhkan oleh sel granulosa diproduksi oleh oosit, demikian juga sebaliknya. Molekul-molekul tersebut dari dan menuju sel granulosa maupun oosit baik pada mekanisme parakrin maupun pertukaran melalui *gap junction* melibatkan properti seperti *Trans Zona Pellucidae (TZP)*, *mikrovili* dan *connexin* yang melewati atau berada di zona pelusida. Jika struktur zona pelusida rusak maka dapat terjadi kerusakan *TZP*, *mikrovili* dan *connexin*, sehingga komunikasi *bidirectional* antara oosit dan sel granulosa terganggu.

Peran *gap junction* dalam interaksi oosit-sel granulosa antara lain memfasilitasi aksi saling mempengaruhi pertumbuhan dan diferensiasi oosit dan sel granulosa. Hal ini terjadi karena *gap junction* memfasilitasi komunikasi *bidirectional* dan memungkinkan transfer nutrisi, prekursor metabolik (seperti asam amino dan nukleotida), molekul pembawa informasi seperti hormon, neurotropin, dan faktor pertumbuhan⁶. Oosit meregulasi pertumbuhan folikel dengan mensekresi faktor pertumbuhan yang bekerja secara parakrin pada sel granulosa di sekitarnya, demikian juga sel granulosa mensekresi faktor parakrin yang dibutuhkan untuk pertumbuhan oosit^{23,24}. Antibodi zona pelusida selain merusak *gap junction* keberadaannya juga mempengaruhi fungsi sel granulosa. Pernyataan ini muncul karena didapatkan bukti bahwa beberapa bagian dari zona pelusida nampak ditemukan pada ruang interseleuler sel granulosa³.

Salah satu fungsi dari sel granulosa adalah memproduksi AMH²⁵. Faktor-faktor pertumbuhan dan diferensiasi yang disekresikan oleh oosit seperti BMP (BMP 4,6,15) dan GDF 9 meningkatkan ekspresi AMH pada folikel yang sedang tumbuh dan berperan dalam pertumbuhan folikel²⁶. Ekspresi AMH diregulasi oleh FSH dan BMP dengan cara yang antagonis. Faktor lain seperti BMP15 dan GDF9 yang disekresikan oosit meregulasi ekspresi AMH melalui jalur Smad 2/3²⁷. Jika

komunikasi melalui *gap junction* dan sinyal parakrin terganggu, maka dapat terjadi gangguan regulasi produksi AMH yang diperankan oleh GDF9, BMP (BMP 4,6,15) sehingga berakibat pada penurunan ekspresi AMH.

Kerusakan struktur zona pelusida dapat menyebabkan gangguan mekanisme parakrin maupun pertukaran molekul secara langsung melalui *gap junction* antara sel granulosa dan oosit. Kedua cara ini dibutuhkan untuk sintesis hormon, seperti AMH. AMH diekspresikan di sel granulosa dan dibutuhkan untuk mengontrol pertumbuhan folikel. Produksi AMH merupakan hasil kerja mekanisme parakrin dan pertukaran molekul secara langsung antara sel granulosa dan oosit, sehingga kerusakan zona pelusida dapat mempengaruhi ekspresi AMH dari sel granulosa.

Anti Mullerian Hormone merupakan marker untuk menilai tingkat kesuburan²⁸. Penurunan ekspresi AMH pada penelitian ini kemungkinan merupakan efek penekanan kesuburan pada pemberian Mab bZP3.

Anti Mulleriane Hormone berperan menghambat perkembangan folikel menjadi folikel antral. Jumlah folikel antral mempengaruhi ukuran cadangan ovarium, cadangan ovarium yang rendah kemungkinan memiliki efek jangka panjang yang akan mempersingkat rentang usia reproduksi wanita²⁸. Semakin banyak folikel yang berkembang menjadi folikel antral secara dini, dapat menyebabkan menurunnya cadangan ovarium dan meningkatkan resiko terjadinya menopause dini.

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian Mab bZP3 tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah folikel antral. Hasil penelitian yang berbeda didapat dari penelitian lain yang dilakukan secara *in vitro* dengan memaparkan antibodi yang memiliki target zona pelusida.

Pemberian antibodi dengan target zona pelusida terbukti mengganggu pembentukan folikel antral. Antibodi ZP2 dan anti-ZP3 pada kultur folikel mencit menyebabkan gangguan pembentukan folikel antral¹². Antibodi ZPA juga terbukti menghambat pembentukan folikel antral dan maturasi oosit²⁹. Dalam kedua

penelitian di atas, faktor pertumbuhan yang bekerja secara endokrin, seperti FSH yang sangat penting untuk transisi folikel pre antral menjadi antral tidak dilibatkan.

Antrum tidak terbentuk pada kondisi dimana tidak diberikan FSH. Ini terbukti dari penelitian secara *in vitro* yang dilakukan menggunakan folikel pre antral dari mencit, yang di paparan FSH beberapa dosis mulai 0, 10, 100, dan 1000 mIU/ml³⁰. Salah satu hormon yang bekerja secara endokrin yang dominan di dalam perkembangan folikel terutama pada tahap perkembangan folikel pre-antral menjadi antral adalah FSH³¹. Folikel antral jarang terbentuk pada manusia maupun hewan dalam kondisi defisiensi FSH maupun ovarium yang memiliki sedikit reseptor FSH³². Hal ini dapat disimpulkan bahwa pengaruh FSH pada tahap seleksi folikel pre antral menjadi antral sangat besar.

Jumlah folikel antral yang tidak berbeda secara signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan pada penelitian ini kemungkinan disebabkan karena spesifisitas yang tinggi dari antibodi monoklonal bZP3. Hal ini memunculkan anggapan bahwa pemberian Mab bZP3 hanya menyebabkan kerusakan pada ZP. Hal ini didasari pada terjadinya penurunan AMH namun tidak disertai dengan peningkatan jumlah folikel antral.

Spesifitas Mab bZP3 telah terbukti dengan uji *Western Bolt*. Mab bZP3 mampu mengenali bZP3 pada berat molekul $79,995 \pm 0,051$ kDa. Hal ini membuktikan bahwa Mab bZP3 hanya mengenali bZP3 bukan molekul ZP lainnya¹.

Tingkat spesifisitas yang semakin tinggi tidak akan menimbulkan *cross reactivity*. Antibodi dengan spesifisitas yang tinggi tidak akan bereaksi dengan protein lain sehingga hanya akan bereaksi dengan protein target¹⁵. Kerusakan yang hanya terjadi pada zona pelusida seperti disebutkan di atas, diduga hanya mengganggu faktor pertumbuhan folikel yang bekerja secara autokrin dan parakrin. Faktor pertumbuhan lain yang bekerja secara endokrin, seperti FSH, yang sangat berpengaruh terhadap proses seleksi pre antral menjadi folikel antral kemungkinan tidak mengalami perubahan. Selain itu, proses lain dalam

folikulogenesis yang tidak melibatkan peran zona pelusida juga tidak terganggu.

Folikel ovarium tumbuh dibawah pengaruh banyak faktor pertumbuhan yang bekerja secara endokrin, parakrin, maupun autokrin. Berbagai faktor pertumbuhan dan perkembangan dihasilkan oleh oosit, sel granulosa dan sel teka yang bekerja secara autokrin dan parakrin, serta sel lain yang bekerja secara endokrin untuk proses perkembangan folikel pre antral menjadi folikel antral. Faktor-faktor tersebut dapat bersifat sebagai inhibitor maupun aktifator, yang dapat berupa faktor pertumbuhan ovarium, sitokin dan neuropeptids³³. Pada tahap seleksi folikel pre antral menjadi antral faktor yang tampak jelas mempengaruhi proses tersebut adalah FSH dan AMH. *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) bekerja menstimulasi pertumbuhan folikel dan AMH menghambat proses tersebut dengan menurunkan sensitifitas folikel terhadap FSH³⁴.

Peningkatan jumlah folikel antral dapat menjadi suatu tanda *Premature Ovarian Failure* (POF). Terdapat kondisi *hypergonadotropichypogonadism* pada penderita POF, yang ditandai dengan meningkatnya kadar FSH dan penurunan inhibin serta AMH. Pada kasus POF, adanya antibodi ZP berhubungan dengan penurunan AMH dan inhibin serta peningkatan FSH. Kondisi ini menyebabkan peningkatan jumlah folikel antral, dan penurunan cadangan ovarium³. Pemberian Mab bZP3 pada penelitian ini kemungkinan tidak menyebabkan kondisi seperti yang terjadi pada penyakit *Premature Ovarian Failure* (POF). Sebagai salah satu bukti adalah jumlah folikel antral yang tidak berbeda secara signifikan antara kelompok kontrol dan perlakuan.

Pada penelitian ini penurunan AMH yang signifikan pada kelompok perlakuan tidak disertai oleh peningkatan yang signifikan jumlah folikel antral. Hal ini diduga salah satunya karena pengerasan ZP dapat menyebabkan kerusakan *connexin* yang membangun *gap junction* antara sel granulosa dan oosit. Sebagai akibatnya meskipun di sisi lain penurunan AMH dapat meningkatkan sensitifitas sel granulosa terhadap FSH, laju perkembangan folikel menjadi folikel antral tidak terjadi dengan pesat.

Hubungan antara oosit dan sel granulosa nampak sebagai kontrol yang paling signifikan dalam koordinasi perkembangan folikel³⁵. Folikulogenesis di ovarium yang menghasilkan oosit yang mampu dibuahi tergantung pada komunikasi intraseluler melalui *gap junction*. *Gap junction* dibentuk oleh *connexin* pada folikel yang sedang berkembang maupun yang sudah matur³⁶.

Pada praktik klinis pengaruh pemberian suatu bahan imunokontrasepsi pada berbagai waktu diperlukan untuk menentukan reversibilitas kesuburan, jadwal pemberian suntikan ulang dan memperkirakan waktu munculnya efek serta kemungkinan mulai meningkatnya resiko efek samping dari suatu imunokontrasepsi. Pengujian efek imunokontrasepsi dari Mab bZP3 dalam menekan kebuntingan dan reversibilitas kesuburan pada berbagai waktu telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Hasil penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan pengaruh pemberian Mab bZP3 terhadap penurunan ekspresi AMH dan peningkatan jumlah folikel antral pada berbagai waktu pengamatan.

Imunisasi Mab bZP3 50 μ l pada mencit dan 100 μ l pada tikus dapat mencegah kehamilan. Mencit dan tikus diamati dalam beberapa waktu selama penelitian. Kebuntingan 100% pada mencit terjadi di hari ke-38, sedangkan pada tikus pada hari ke-126 μ l¹⁸. Pemberian antibodi monoklonal rat ZP3 IgG2a pada mencit terbukti mencegah kehamilan yang tidak permanen²⁰. Penelitian lain menunjukkan hasil yang serupa. Pemberian satu kali antibodi *anti-cumulus oophorus* dapat mencegah kebuntingan secara tidak permanen. Pada mencit yang diberi antibodi *anti-cumulus oophorus* angka kebuntingan menurun. Namun, reversibilitas kesuburan terjadi 30 hari setelah injeksi antibodi *anti-cumulus oophorus*. Reversibilitas kesuburan kemungkinan terjadi karena telah terjadi eliminasi antibodi secara sempurna³⁴.

Tidak adanya perbedaan ekspresi AMH antar siklus pada penelitian ini, serupa dengan hasil penelitian lain. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan kadar AMH antar siklus pada pasien infertil³⁷. Ini memberi kesan bahwa kondisi pada pemberian mab bZP3 mirip dengan yang terjadi pada kelompok kontrol.

Jumlah folikel antral berkorelasi negatif dengan usia wanita, semakin tua usia, jumlah folikel antral semakin berkurang³⁸. Jumlah folikel antral nampak tiap siklus mengalami penurunan, baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Kemungkinan hal ini karena bertambahnya usia mencit. Kemungkinan terjadinya penurunan jumlah folikel antral yang mengikuti pola linear ini, terkait dengan usia kronologis mencit.

Pada penelitian ini tidak adanya perbedaan ekspresi AMH dan jumlah folikel antral antar waktu pengamatan kemungkinan disebabkan karena kurangnya variasi rentang waktu pengamatan. Perubahan pada kedua parameter kemungkinan baru terjadi setelah 20 hari, sesuai dengan waktu eliminasi IgG. Pada penelitian *in vivo*, penilaian efek dan lama efek suatu bahan atau obat termasuk imunoglobulin (antibodi) sangat bergantung pada farmakodinamik bahan atau obat tersebut.

Beberapa kelas imunoglobulin (IgG, IgA, IgM, IgD maupun IgE) dapat digunakan sebagai imunisasi pasif, tergantung pada penggunaannya. Pertimbangan dalam penggunaan imunoglobulin antara lain: 1) waktu paruh intravaskular; 2) kecepatan katabolisme; dan 3) aplikasi spesifik dari kelas imunoglobulin tertentu². Imunoglobulin G (IgG) tidak dieliminasi ke dalam urin karena ukuran molekulnya yang besar. Imunoglobulin G memiliki waktu paruh terpanjang yaitu 21 hari. Kondisi seperti ini sesuai untuk aktivitas dalam jangka panjang pada penggunaan secara sistemik³⁹. Salah satu keuntungan penggunaan imunisasi pasif yaitu efek segera karena tidak menunggu respon imun seperti imunisasi aktif dalam memunculkan efek. Pada pemberian antibodi imunitas diperoleh segera setelah suntikan, dan berlangsung selama masa hidup IgG secara *in vivo* yaitu sekitar 3 minggu⁴⁰.

5. SIMPULAN

Monoklonal antibodi zona pelusida 3 (Mab bZP3) terbukti berpengaruh menurunkan ekspresi AMH, namun tidak berpengaruh terhadap jumlah folikel antral. Tidak terdapat perbedaan pengaruh pemberian Mab bZP3 terhadap ekspresi AMH dan jumlah folikel antral pada berbagai waktu pengamatan.

Penurunan ekspresi AMH dapat menjadi salah satu bukti peran Mab bZP3 sebagai bahan imunokontrasepsi dalam menekan fertilitas. Jumlah folikel antral yang tidak meningkat secara signifikan memberi petunjuk bahwa Mab bZP3 tidak berpotensi meningkatkan resiko menopause dini. Keamanan dan reversibilitas Mab bZP3 perlu diteliti lebih lanjut.

6. REFERENSI

- Sumitro, S.B., Aulanni'am, Soewart, S., Ciptadi, G., Widyarti, S., and Kurniawan, D. 2011. *Imunokontrasepsi Konsep-Konsep Dasar dan Bunga Rampai Penelitian*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Naz, R.K., and Rajesh, C., 2004. *Passive immunization for immunokontrasepsi: lessons learned from infectious diseases*, *J. Front Biosci.* **9** (1): 2457-2465.
- Koyama, K., and Hasegawa, A., 2006. *Premature ovarian failure syndrome may be induced by autoimmune reactions to zona pellucida proteins*, *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology.* **3** (2): 94-7.
- Gruijters, M.J., Visser, J.A., Durlinger, A.L. and Themmen, A.P., 2003. *Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function*, *J. Molecular and cellular endocrinology.* **211** (1): 85-90.
- Visser, J.A., and Themmen, A.P., 2005. *'Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis*, *J. Molecular and Cellular Endocrinology.* **234** (1): 81-6.
- van den Hurk, R., and Zhao, J., 2005. *Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles*, *J. Theriogenology.* **63** (6): 1717-51.
- Ireland, J., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G., Perez, G., Evans, A., and Ireland, J., 2008. *Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle*,

- J. Biology of reproduction.* **79** (6): 1219-25.
- Roudebush, W.E., Kivens, W.J., and Mattke, J.M., 2008. Biomarkers of ovarian reserve, *J. Biomarker Insights.* **3**: 259-268
- Deb, S., Campbell, B., Clewes, J., Pincott-Allen, C., and Raine-Fenning, N., 2013. Intracycle variation in number of antral follicles stratified by size and in endocrine markers of ovarian reserve in women with normal ovulatory menstrual cycles, *J. Ultrasound in Obstetrics & Gynecology.* **41** (2): 216-22.
- Gruijters, M.J.G. 2004. *Anti-Müllerian Hormone: Function and Molecular Mechanism of Action in the Ovary*, Erasmus MC: University Medical Center Rotterdam.
<http://hdl.handle.net/1765/7270t>
downloaded at March 29th 2014.
- Salmon, N.A., Handyside, A.H., and Joyce, I.M., 2004. Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice, *J. Developmental Biology.* **266** (1): 201-8.
- Calongos, G., Hasegawa, A., Komori, S., and Koyama, K., 2009. Harmful effects of anti-zona pellucida antibodies in folliculogenesis, oogenesis, and fertilization, *J. Reproductive Immunology.* **79** (2):148-55.
- Creasy, D., Cartwright, J., Moreland, S., Willoughby, C., Collier, M., And Odum, J. 2008. *Female Reproductive System*. In: *Endocrine Disruption Guidelines for Histological Evaluation.*
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/40581116.pdf>
- Novak, M., Madej, J.A., Dziegeil, P. 2007. Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. *J. Bull Vet inst Pulawy .* **51** (2): 275-9.
- Abbas, A.K., Litchman, A.H., and Pillai, S. 2007. Cellular and Molecular Immunology, 6th edition. Saunders an imprint of Elsevier Inc. Philadelphia. p. 9-11.
- Subowo. 2009. *Imunologi. Edisi 2.* Sagung Seto. Jakarta. pp: 191-256.
- Wassarman, P.M., 2008. Zona pellucida glycoproteins, *Journal of Biological Chemistry.* **283** (36): 24285-9.
- Pantiwati, Y., 2012. Passive immunization of anti bZP3 (zona pelusida3) in wistar rat (*Rattus Norvegicus*) and mouse (*Mus Musculus*), *J. Media Peternakan.* **1**: 163-9.
- Widodo, E., and Aulanni'am, 2005. Specificity of antibody bovine zonna pellucidae 3 to rabbit ZP3 based on bZP3 as contraceptive antigens, *Indo. J. Chem.* **5** (2): 182-7.
- Lloyd, M.L., Papadimitriou, J.M., O'Leary, S., Robertson, S.A., and Shellam, G.R. 2010. Immunoglobulin to zona pellucida 3 mediates ovarian damage and infertility after contraceptive vaccination in mice. *Journal of autoimmunity.* **35** (1): 77-85.
- Baratawidjaya, K.G., and Rengganis, I. 2013. *Imunologi Dasar. Edisi 10.* Balai Penerbit FKUI, Jakarta. pp: 151-608
- Borillo, J., Coonrod, S.A., Wu, J., Zhou, C., and Lou, Y. 2008. Antibodies to two ZP3 B cell epitopes affect zona pellucida assembly. *Journal of reproductive immunology.* **78**(2):149-57.
- Gittens, J.E., Barr, K.J., Vanderhyden, B.C., and Kidder, G.M., 2005. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles, *J. Cell Science.* **118** (1): 113-22.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Myllymaa, S., Kaivo-Oja, N., Dragovic, R.A., Hickey, T.E., Ritvos, O., and Mottershead, D.G., 2006. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation, *J. Cell Science.* **119** (8): 3811-21
- Josso, N., di Clemente, N., and Gouédard, L., 2001. Anti-Müllerian hormone and its

- receptor, *J. Molecular and cellular endocrinology*. **179** (1): 25-32.
- Rico, C., Médigue, C., Fabre, S., Jarrier, P., Bontoux, M., Clément, F., and Monniaux, D., 2011. Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow: a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulosa cell levels, *J. Biology of Reproduction*. **84** (3): 560-71.
- Sadeu, J.C., Adriaenssens, T., and Smitz, J., 2008. Expression of growth differentiation factor 9, bone morphogenetic protein 15, and anti-Müllerian hormone in cultured mouse primary follicles, *J. Reproduction*. **136** (2):195-203.
- Bentzen, J., Forman, J., Larsen, E., Pinborg, A., Johannsen, T., Schmidt, L., Friis-Hansen, L., and Andersen, A.N., 2012. Maternal menopause as a predictor of anti-Müllerian hormone level and antral follicle count in daughters during reproductive age, *J. Human Reproduction*. p. **28** (1): 247-255.6.
- Koyama, K., Hasegawa, A., Mochida, N., and Calongos, G., 2005. Follicular dysfunction induced by autoimmunity to zona pellucida, *J. Reprod Biol* **5** (3): 269-78.
- Mitchell, L.M., Kennedy, C.R., and Hartshorne, G.M. 2002, Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *J. Human Reproduction*. **17** (5): 1181-8.
- Demeestere, I., Centner, J., Gervy, C., Englert, Y., and Delbaere, A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *J. Reproduction*. **130** (2): 147-56.
- Strauss, J.F., and Barbieri, R.L. 2014. Female Infertility', in Strauss, J.F., and Barbieri, R.L. Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Management. 7th Edition. Saunders an imprint of Elsevier Inc. Philadelphia. pp. 512-37.
- Chedrese, P.J. 2009. Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach. Springer. New York. pp. 241-6
- Gruijters, M.J., Visser, J.A., Durlinger, A.L. and Themmen, A.P., 2003. Anti-Müllerian hormone and its role in ovarian function, *J. Molecular and cellular endocrinology*. **211** (1): 85-90.
- Palma, G.A., Argañaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.Á., and Sinowatz, F., 2012. Biology and biotechnology of follicle development, *The Scientific World Journal*.
- Kidder, G.M., and Mhawi, A.A., 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis, *J. Reproduction*. **123** (5): 613-20.
- Disseldorp, J.V., Lambalk, C.B., Kwee, J. Looman, C.W.N., Eijkmans, M.J.C, Fauser, B.C., and Broekmans, F.J. Comparison of inter- and intra cycle variability of anti-Müllerian Hormone and antral follicle counts. *J. Reproductive Endocrinology*. **25** (1): 221-7.
- Tesarik, J., Testart, J., Leca, G, and Nomé, F. 1990. Reversible inhibition of fertility in mice by passive immunization with anticumulus oophorus antibodies. *J. Biology of reproduction*. **43** (3): 385-91.
- Keizer, R.J., Huitema, A.D., Schellens, J.H., and Beijnen, J.H., 2010. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies, *J. Clinical pharmacokinetics*. **49** (8): 493-507.
- Delves, P.J., and Roitt, I., 2005. Vaccines for the control of reproduction--status in mammals, and aspects of comparative interest, *J. Dev Biol (Basel)*. **121**: 265-73.