

PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL HASIL INDUKSI ISOLAT PROTEIN NON KINASE DARI MEMBRAN SPERMATOZOAMANUSIA

Umie Lestari, Basuki B. Purnomo, Soetomo Soewarto, Aulanni'am, Sutiman B. Sumitro

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to study the profile of human spermatozoa membrane protein based on identification of molecular weight, protein concentration, phosphorylation activity, and antibody production. **Material and method:** There are three phases in this study. First, isolation of human spermatozoa membrane protein using a lysis buffer containing Tween-20. Second, determination of molecular weight, phosphorylation activity, and protein concentration. Third, determination of antibody production. Molecular weight of protein membrane was determined by SDS-PAGE, confirmation of protein concentration as measured by Biuret method, kinase activity was measured by spectrophotometry at its optimum condition, and production of antibodies were confirmed by ELISA. **Results:** Human spermatozoa contained proteins with molecular weights of 201, 163, 116, 97, 72, 56, 48, 32, 27, 20, and 17 kDa. The highest phosphorylation activity was found in the protein with molecular weight of 20 kDa, $30,197 \times 10^{-3}$ unit. Lowest phosphorylation activity of $28,976 \times 10^{-3}$ unit was shown in protein with 116 kDa of molecular weight. This protein was shown to induce production of antibodies. Biuret method showed the protein concentration of 116 kDa protein of $410 \mu\text{g/mL}$. **Conclusion:** The protein with molecular weight of 116 kDa can be used as an immunocontraception agent because of lower phosphorylation activity, good concentration, and ability to induce production of antibodies.

Keywords: Protein non phosphorylation activity, human spermatozoa membrane, antibody.

Correspondence: Umie Lestari, c/o: Departemen Biologi/Universitas Brawijaya. Jl. Veteran Malang.

PENDAHULUAN

Pada umumnya protein membran spermatozoa memiliki struktur dan fungsi yang sama dengan protein membran sel somatik,¹ namun ada beberapa macam protein yang spesifik dimiliki oleh membran spermatozoa, sehingga mengakibatkan fungsinya menjadi berbeda. Misalnya protein yang berada dipermukaan membran memiliki kemampuan untuk pengenalan dan berikatan dengan glikoprotein Zona Pelucida (ZP) dan melaksanakan fusi dengan membran sel telur.² Adapun molekul yang berfungsi sebagai pengenal glikoprotein ZP dapat berbentuk protein, enzim, maupun glikoprotein.

Protein membran spermatozoa yang berfungsi didalam kapasitas maupun reaksi akrosom di antaranya bertindak sebagai enzim. Enzim yang berperan di dalam fosforilasi berfungsi untuk mentransfer fosfat dari Adenosine Tri Phosphate (ATP) ke serin dan threonin, sehingga menimbulkan fosfat berenergi tinggi yang digunakan untuk kelangsungan proses transduksi signal dan perubahan metabolisme sel.³

Pengembangan bahan imunokontrasepsi adalah didasarkan adanya interaksi protein membran spermatozoa yang berperan aktif dalam interaksinya dengan zona pelucida (ZP3).⁴ Menurut Naz (2004), protein membran spermatozoa yang dipergunakan sebagai kandidat imunokontrasepsi memiliki suatu kriteria penting, yaitu merupakan suatu protein spesifik yang hanya diekspresikan oleh spermatozoa.⁵

Protein yang terlibat dalam fosforilasi pada umumnya dimiliki oleh sel eukariotik, yaitu sel somatik karena berkaitan dengan fungsinya sebagai molekul yang terlibat dalam mekanisme fundamental. Menurut Hunter (2000), mekanisme fundamental yang berlangsung dalam sel meliputi kontrol kejadian seluler, dalam bentuk pembelahan dan pertumbuhan sel, adhesi, dan migrasi, aktifitas metabolik dan respon terhadap stimuli lingkungan, komunikasi sel, transduksi signal, dan apoptosis.^{6,7}

Protein dengan fungsi umum seperti yang ditunjukkan oleh protein yang terlibat dalam fosforilasi akan terganggu fungsinya, apabila dikenakan antibodi dari protein tersebut.

Oleh karena itu, perlu eksplorasi tentang karakter protein struktural yang terdapat pada membran spermatozoa manusia, terutama yang berkaitan fungsinya dalam fosforilasi. Protein yang tidak berfungsi dalam fosforilasi diharapkan dapat menginduksi antibodi spesifik, sehingga dapat dipertimbangkan sebagai bahan pengembang imunokontrasepsi. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh (1) karakter protein membran spermatozoa manusia, (2) protein membran spermatozoa yang tidak beraktifitas fosforilasi atau beraktifitas rendah, dan (3) antibodi hasil induksi protein non kinase.

TUJUAN PENELITIAN

Memperoleh profil protein membran spermatozoa manusia berdasarkan atas berat molekul, kadar protein, aktifitas fosforilasi, dan protein tersebut dapat menginduksi produksi antibodi.

BAHAN DAN CARA

Setelah mendapat persetujuan dari Komite Etika FK Universitas Brawijaya/RS Saiful Anwar Malang, semen diperoleh dari pria fertil penderita varikokel yang dalam analisis semennya tidak mengalami kelainan. Pasien yang digunakan dalam penelitian ini sebanyak 35 orang, dengan kisaran umur 25 - 40 tahun. Evaluasi terhadap semen dilakukan pada suhu ruang 37°C, dilakukan untuk mendapatkan data tentang konsentrasi, motilitas, morfologi, viskositas, dan pH berdasarkan standar Organisasi Kesehatan Dunia (WHO).⁸ Langkah selanjutnya dilakukan isolasi untuk mendapatkan isolat protein membran spermatozoa manusia menggunakan detergen Tween-20,^{9,10} dan sentrifugasi 12.000 rpm pada suhu 4°C. Isolat protein membran spermatozoa diencerkan dengan buffer Tris-Cl.

Selanjutnya dilakukan penentuan berat molekul protein spermatozoa dengan menggunakan Elektroforesis Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrilamide Gell Electrophoresis (SDS-PAGE), dan untuk mendapatkan masing-masing pita protein dilakukan mikro elektroelusi.¹¹ Kadar protein masing-masing protein membran ditentukan dengan metode biuret.¹²

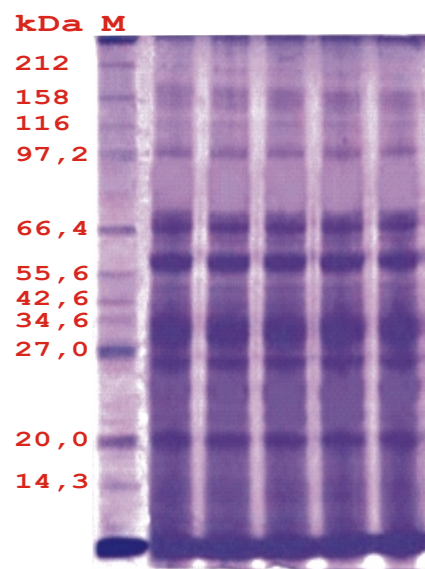
Uji aktifitas fosforilasi dari masing-masing protein membran spermatozoa dilakukan pada pH optimum aktifitas kinase sebesar 6,8,¹³ dipergunakan variasi suhu sebesar 33°C, 35°C, 37°C, dan 39°C, sedangkan untuk variasi waktu inkubasi, aktifitas kinase ditentukan dengan menghitung banyaknya ATP dalam satuan *part permillion*

(ppm) yang bereaksi, dengan menggunakan persamaan kurva baku ATP, selanjutnya unit aktifitas kinase dihitung berdasarkan rumus yang terdapat dalam Aulanni'am.¹² Setelah diperoleh protein dengan aktifitas kinase yang rendah atau tidak beraktifitas sama sekali, maka protein non kinase tersebut diimunisasikan pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) betina secara subkutan. Imunisasi dibantu dengan penambahan *complete freuds adjuvant* (CFA) dan *incomplete freuds adjuvant* (IFA),¹⁴ yang berfungsi memperbesar respon imun. *Booster* pertama dilakukan setelah 2 minggu penyuntikan pertama dan *booster* ke dua dilakukan 2 minggu setelah *booster* pertama. Sebagai pembanding digunakan kelinci tanpa perlakuan (kontrol).

Serum diperoleh dari pemanenan darah kelinci yang diambil dari vena telinga (*vena auricularis*). Darah kelinci diinkubasi dan disentrifugasi 1500 rpm. lalu diambil supernatannya dan digunakan untuk pemurnian IgG. Isolasi Immunoglobulin (antibodi) dilakukan dengan teknik presipitasi ammonium sulfat.¹⁵ Pengukuran titer antibodi protein membran spermatozoa dipakai metode *indirect* ELISA dan dibaca pada ELISA reader sistem BIO-RAD.¹⁶

HASIL PENELITIAN

Hasil elektroforesis SDS-PAGE pada *isolate crude protein* membran spermatozoa manusia menunjukkan pita protein membran dengan berat molekul 201, 163, 116, 97, 72, 56, 48, 32, 27, 20, dan 17 kDa (gambar 1).

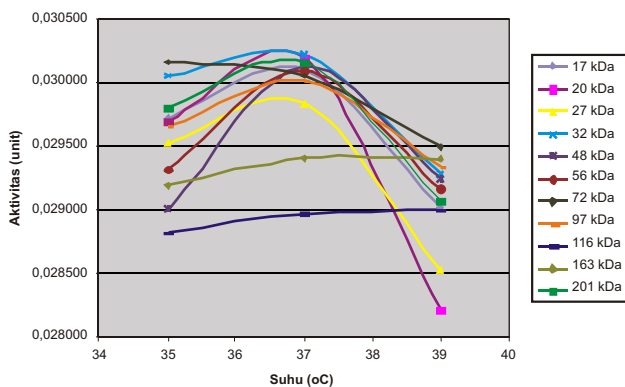


Gambar 1. Profil protein membran spermatozoa manusia, hasil elektrophoresis SDS-PAGE.

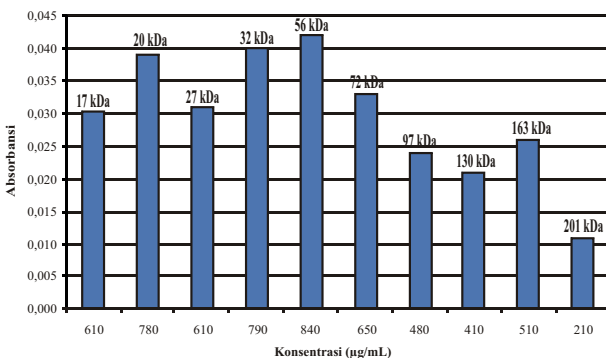
Hasil uji aktifitas fosforilasi pada masing-masing protein dengan berat molekul 201, 163, 116, 97, 72, 56, 48, 32, 27, 20, dan 17 kDa, pada temperatur $\pm 37^\circ\text{C}$ waktu inkubasi 120 menit menunjukkan aktifitas fosforilasi tertinggi pada protein dengan berat molekul 20 kDa sebesar 30.08×10^{-3} , sedangkan untuk aktifitas fosforilasi terendah ditunjukkan oleh protein dengan berat molekul 163 dan 116 kDa yaitu 29.404×10^{-3} dan 29.976×10^{-3} (gambar 2).

Dari hasil uji biuret didapatkan kadar protein dari masing-masing protein berat molekul 201, 163, 116, 97, 72, 56, 48, 32, 27, 20, dan 17 kDa berturut-turut adalah 210, 510, 410, 480, 650, 840, 790, 610, 780, dan 610 $\mu\text{g/ml}$ (gambar 3).

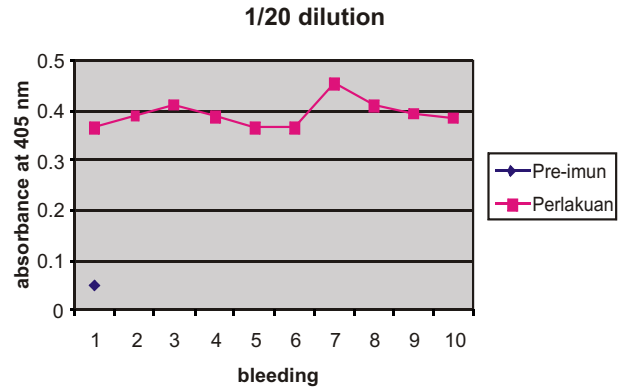
Antibodi protein 116 kDa yang dihasilkan dari induksi protein 116 kDa pada kelinci betina diukur dengan metode *indirect* ELISA. Antibodi protein 116 kDa diukur berdasarkan nilai absorbansi 405 nm pada ELISA reader. Gambar 4 adalah hasil titer antibodi (IgG) terhadap protein 116 kDa pada kelompok kelinci dengan pengenceran 1/20 (gambar 4).



Gambar 2. Grafik aktifitas fosforilasi dari protein membran spermatozoa manusia.



Gambar 3. Histogram yang menunjukkan kadar protein dari protein membran spermatozoa manusia berat molekul 201, 163, 116, 97, 72, 56, 48, 32, 27, 20, dan 17 kDa, dengan menggunakan uji biuret.



Gambar 4. Grafik profil antibodi protein 116 kDa pada kelompok kelinci perlakuan dan preimun (sebelum imunisasi).

PEMBAHASAN

Hasil uji aktifitas kinase terhadap 11 macam isolat protein membran spermatozoa menunjukkan aktifitas tertingginya, yaitu pada temperatur 37°C dan waktu inkubasinya adalah 120 menit. Temperatur optimal 37°C kemungkinan meningkatkan interaksi antara enzim kinase dengan substrat, sedangkan waktu inkubasi 120 menit merupakan waktu optimal yang diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat, sehingga aktifitas enzim meningkat maksimal. Suhu dan waktu optimal yang menunjukkan aktifitas protein kinase tertinggi tersebut juga ditunjukkan dalam penelitian Naz,¹⁷ yang menggunakan *assay kinase* dalam pengukuran uji kinase.

Aktifitas fosforilasi yang umumnya berfungsi untuk kontrol seluler jaringan somatik, terjadi juga pada spermatozoa yang kemungkinan besar dilakukan oleh protein kinase yang memiliki gugus serin, threonin, dan tirosin.⁵ Gugus ini memiliki kemampuan untuk mengikat satu gugus fosfat ATP yang selanjutnya mentransfer ke molekul histon. Dari kesamaan adanya aktifitas ini menunjukkan bahwa gugus serin, threonin, dan tirosin, terdapat juga pada protein membran spermatozoa seperti halnya sel somatik. Bahan yang akan dikembangkan untuk imunokontrasepsi diperlukan suatu kespesifikan protein yang hanya dihasilkan oleh spermatozoa,⁴ hal ini nampaknya ditunjukkan oleh protein 116 dan 163 kDa, yang memiliki aktifitas fosforilasi rendah dan kemungkinannya tidak terdapat pada jaringan somatik.

Hasil uji biuret menunjukkan bahwa semua kadar protein pada masing-masing isolat protein membran yang telah teridentifikasi, memenuhi syarat minimal penggunaan protein sebagai antigen, yaitu sebesar 300 $\mu\text{g}/200 \text{ ml}$ pelarut.¹⁸ Protein 163 dan 116 kDa memiliki kadar protein

sebesar 510 dan 410 µg/ml, dengan demikian kedua protein tersebut dapat dipergunakan sebagai antigen, sedangkan titer antibodi protein non kinase dengan berat molekul 116 kDa menunjukkan tertinggi pada *bleeding* ke 7 atau hari ke 58, setelah *booster* kedua. Hal ini menunjukkan bahwa protein 116 kDa mampu menginduksi produksi antibodi protein 116 kDa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, et al. Essential cell biology: An introduction to the molecular biology of the cell. New York & London: Garland Publishing, Inc; 1998.
2. Serrano H, Dolres GS. Molecular aspects of mammalian fertilization. Asian Journal of Andrology 2003; 3: 243 - 9.
3. Kikuchi J. Oxford biomedical research. In: Biomedical reviews. The University of Tokyo, Bunkyo-Ku, Tokyo, Japan. 1995; 49: 253 - 9.
4. Naz RK. Antisperm immunity for contraception. Journal of Andrology 2006; 27: 153 - 9.
5. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. Rep Biol Endol 2004; 2: 1 - 12.
6. Hunter T. Signaling-2000 and beyond. Cell 2000; 100: 113 - 27.
7. Hardie DG. Metabolic control: A new solution to an old problem. Curr. Biol 2000; 10: 757 - 9.
8. World Health Organization. Who laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
9. Bohring C, Krause E, Habermann B, Krause W. Isolation and identification of sperm membrane antigens recognized by antisperm antibodies, and their possible role in immunological infertility disease. Mol Hum Reprod 2001; 7: 113 - 8.
10. Rajeev SK, Reddy KVR. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: Identification and characterization of fertility associated sperm antigen. Hum Reprod 2004; 19: 234 - 42.
11. Bhadway D. Electroelution of protein from SDS PAGE for use immunozation. 1999. Devesh@icgeb.Res
12. Aulanni'am. Protein dan analisisnya. Malang: Citra Mentari Group; 2005.
13. Naz RK. Vaccine for contraception targeting sperm. Immunological Reviews 1999; 171: 193 - 203.
14. Griffin PD. Contraceptive vaccines: Special programme of research. Development and Research Training in Human Reproduction. WHO.1211. Genewa Switzerland; 2003.
15. Goers J. Immunochemical techniques laboratory manual. San Diego California: Academic Press Harcount Brace Iovanovich Publisher; 1993.
16. Auer J, Senechal H, Desvaux FX. Isolation and characterization of two sperm membrane proteins recognized by sperm associated antibodies in infertile men. Mol Reprod Dev 2000; 57: 393 - 405.
17. Naz RK, Zhu X, Arjun LK. Identification of human sperm peptide sequence involved in egg binding for immunocontraception. Biol of Reprod 2000; 62: 318 - 24.
18. Subowo. Immunobiologi. Bandung: Angkasa; 1993.