

Studi Awal

Upaya Eksplorasi Agensia Imunokontrasepsi Untuk Regulasi Fertilitas Hewan Liar : Pofil Protein Selama Proses Implantasi Embrio Mencit (*Mus musculus L.*) BALB/c.

Agung Janika Sitasiwi dan M. Anwar Djaelani
Laboratorium Biologi dan Struktur Fungsi Hewan FMIPA Undip

Abstract

Study on exploration of immunocontraception agents for wildlife fertility regulation has been conducted. The aim of this study was carried to find out the protein which functionable in mice embryos implantation. The outcome of this study should be applied to control the fertility of wildlife animals. This research conducted during ten months in BSF Laboratory of Biology Department FMIPA UNDIP and 3rd Unit of UGM LPPT. Adult female and male mice with 28 – 30 grams in weight were used as laboratory animals. Mice were divide into two groups, one group as positive control group without mated, the other were mated group. Mice handled and breded in laboratory condition. The precise day of pregnancy were determined with vaginal plug existences in female mice. Protein were isolated from uterus on day 1st to 5th of pregnancy. Protein isolation and separation with electrophoresis were based on Bio-rad manual. This study show that there are no differences in protein band between positive control group and pregnant group. These study suggested that protein determining embryo implantation process is regulatory protein which it has expressed in short time and fast withdrawl.

Key words: immunocontraception, control the fertility, regulatory protein

Abstrak

Penelitian awal mengenai eksplorasi agensia imunokontrasepsi untuk regulasi fertilitas hewan liar telah dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan atau mengisolasi protein yang menentukan keberhasilan implantasi embrio pada mencit (*Mus musculus L.*). Luaran penelitian ini adalah protein yang berpotensi sebagai agensia imunokontrasepsi sehingga dapat dimanfaatkan untuk *fertility control* hewan liar. Penelitian dilakukan selama sepuluh bulan di Laboratorium BSF Hewan Jurusan Biologi FMIPA UNDIP dan LPPT Unit III UGM. Hewan uji yang digunakan adalah mencit BALB/c betina dan jantan dewasa kelamin dengan berat berkisar 28- 30 gram. Mencit dibagi dalam dua kelompok control, satu kelompok sebagai kontrol positif (tidak dikawinkan) sedangkan kelompok lain adalah kelompok yang dikawinkan. Mencit dipelihara dan dikawinkan dalam kondisi laboratorium yang terkontrol. Kebuntingan ditentukan dengan adanya *vaginal plug* pada mencit betina. Protein diisolasi dari sampel uterus yang diambil pada usia kebuntingan satu sampai lima hari. Isolasi dan separasi protein dilakukan berdasar manual dan standard protein produk Bio-Rad. Penelitian ini menunjukkan *band* protein yang sama antara mencit yang dikawinkan dengan mencit kontrol sehingga dapat disimpulkan bahwa protein penentu implantasi embrio merupakan *regulatory protein* yang diekspresikan dalam waktu yang singkat dan *withdrawl* yang cepat.

Key words: .imunokontrasepsi, fertility control, regulatory protein

PENDAHULUAN

Fertility control merupakan metode pengaturan fertilitas hewan dengan tujuan mengendalikan populasi hewan, terutama hewan liar (Cowan and Biscoe, 1997; Robinson *et al.*, 1997). *Fertility control* untuk hewan liar saat ini sangat intensif dilakukan karena hewan liar dapat menimbulkan beberapa efek yang merugikan, baik bagi kehidupan hewan lain ataupun kehidupan

manusia. Hewan liar memiliki empat pengaruh utama, yaitu degradasi lingkungan, ancaman terhadap hewan dan tanaman asli, kehilangan produksi primer dan sumber penyakit. Beberapa spesies hewan liar juga menjadi pembawa atau mengubah inang menjadi pembawa penyakit yang potensial, misalnya tuberkulosa serta rabies (Cowan dan Biscoe, 1997).

Metode *fertility control* yang konvensional dilakukan metode penembakan, pemberian racun atau perangkap. Namun, metode tersebut tidak efektif untuk meregulasi populasi hewan liar dengan populasi yang besar dan jarak edar yang luas (Smith *et al.*, 1997). Salah satu metode *fertility control* yang sudah dan terus dikembangkan adalah imunokontrasepsi. Metoda ini merupakan metoda *biological control* yang dianggap lebih humanis dan mampu menjaga kualitas lingkungan (Barlow, 1997). Imunokontrasepsi juga merupakan metoda kontrasepsi yang lebih baik, mudah diterapkan, efektif, relatif murah untuk populasi hewan yang besar serta dapat diterima dengan baik oleh berbagai kalangan (Smith *et al.*, 1997; Barlow, 1997).

Prinsip metoda imunokontrasepsi adalah memacu respons imun hewan target dengan antigen yang berperan dalam sebagian tahap reproduksi sehingga laju reproduksi dapat dikontrol (Smith *et al.*, 1997; Barlow, 1997). Metoda imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan memasukkan vaksin secara langsung ke dalam tubuh hewan target atau melalui organisme lain yang berperan sebagai antigen serta vektor pembawa agensia tersebut, sehingga mampu memacu pembentukan antibodi pada hewan target (Hardy *et al.*, 2007). Tujuan *fertility control* dengan menggunakan teknik imunokontrasepsi dalam skala besar adalah menimbulkan respons imun dan menjaga efektifitas respons imun untuk mengganggu proses yang terjadi dalam saluran reproduksi. Gangguan proses reproduksi pada akhirnya dapat menurunkan laju reproduksi hewan target (Ramsay dan Ramshaw, 1997).

Metode imunokontrasepsi yang paling sering digunakan dalam regulasi fertilitas hewan adalah vaksin kontraseptif. Vaksin kontraseptif telah digunakan untuk menekan fertilitas beberapa hewan dengan cara memacu respons autoimun terhadap molekul yang esensial dalam proses reproduksi. Delves *et al.* (2002) dan Ferro (2002) menyatakan bahwa imunisasi hewan target dengan protein yang berasal dari spermatozoa, testis, ovarium, hormon dan protein reseptornya telah terbukti berhasil dalam menurunkan fertilitas pada sejumlah spesies. Pemberian vaksin ini dapat dilakukan dengan cara menginfeksi langsung

pada hewan target atau dengan perantara vektor pembawa (Naz *et al.*, 2005).

Metode imunokontrasepsi memerlukan komponen utama berupa protein yang esensial untuk proses reproduksi hewan yang dapat digunakan sebagai agensia penginfeksi hewan target sehingga menimbulkan respon imun. Metoda ini terbukti dapat digunakan untuk meregulasi fertilitas hewan, baik hewan domestikasi maupun hewan liar, sehingga hewan target memiliki respon imun secara alami dan regulasi fertilitas dapat berjalan secara alami pula (Hardy *et al.*, 2004).

Konsep imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi dan mengidentifikasi protein atau peptida yang berperan penting dalam proses reproduksi. Apabila protein ini telah diidentifikasi maka dapat dilakukan identifikasi gen pengkode protein atau peptida tersebut (Robinson *et al.*, 1997; Hardy *et al.*, 2004). Selanjutnya, dapat dilakukan manipulasi protein atau gen sebagai antigen untuk memacu respons imun hewan target.

Holland *et al.* (1997) menyatakan bahwa molekul antigen harus memenuhi beberapa kriteria, yaitu : protein memiliki fungsi esensial dalam tahap reproduksi dan tidak tergantikan, protein harus spesifik untuk gamet dan tidak diekspresikan pada jaringan somatik, sangat imunogenik atau dapat dimanipulasi, gen pengkode protein tersebut dapat dimanipulasi. Bradley *et al.* (1999) dalam Hardy *et al.* (2004) menyatakan bahwa antigen juga sebaiknya bersifat *species-specific*. Grandy dan Rutberg, (2002) dalam Hardy *et al.* (2004) menyatakan bahwa antigen terpilih untuk vaksin kontrasepsi harus efektif, tahan lama, murah dan mudah diterapkan serta tidak memiliki efek samping. Immunogenitas suatu antigen ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu harus bersifat asing, molekul berukuran cukup besar, serta susunan molekul kompleks (Stites *et al.*, 2002; Roitt *et al.*, 2005).

Beberapa peptida telah berhasil diisolasi terekspresi dalam proses reproduksi serta dapat dijadikan agensia imunokontrasepsi, terutama pada tikus dan kelinci. Peptida tersebut adalah *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), 27kDa *heat-shock protein* (HSP) plasenta, reseptor *leukemia inhibitory factor*

(LIFR), glikoprotein oviduk (OGP), proliferin (PLF), prolactin (PRL), protein sperma (SP56) dan sub unit zona pellucida (ZP1 dan ZP3) (Nie *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997; Rice and Chart, 1998; Hu *et al.*, 2007).

Nie *et al.*, (1997) menyatakan bahwa ada target baru untuk kontrasepsi, yaitu dengan menganalisis ekspresi gen spesifik dalam uterus pada periode kritis implantasi embrio. Hal tersebut disebabkan interaksi antara blastokista dan uterus pada saat implantasi merupakan proses yang kompleks dan belum dimengerti secara lengkap. Interaksi yang kompleks antara blastokista dan uterus memerlukan koordinasi ekspresi protein secara terintegrasi. Saat ini telah ditemukan 16 jenis mRNA yang terekspresi pada periode tersebut, enam diantara mRNA tersebut ditemukan dalam konsentrasi yang kecil (*down regulated*) pada *implantation sites*. Diantara mRNA yang telah ditemukan tersebut juga belum diteliti lebih lanjut mRNA yang berpotensi sebagai agensia immuokontrasepsi.

Implantasi merupakan serangkaian proses yang kompleks dengan beberapa regulator, berupa protein, sitokin, serta *growth factor*. Beberapa protein esensial dalam proses implantasi yang diekspresikan dalam uterus diantaranya *heparin binding epidermal growth factor*, *leukimia inhibitory factor*, COX2, integrin spesifik dan inhibitor metalloprotein. Pada blastokista, protein esensial yang berperan dalam proses tersebut diantaranya proteoglikan heparin sulfat, *adhesion promoting activities* dan beberapa EGF. Sitokin, terutama IL-1, juga merupakan protein yang esensial dalam proses implantasi embrio (Rice and Chart, 1998; Carson *et al.*, 2000; Norwitz *et al.*, 2001; Cross, 2002; Hardy dan Spanos, 2002; Paria *et al.*, 2002).

Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi protein yang diekspresikan pada periode implantasi embrio, dengan menggunakan mencit sebagai hewan coba. Selanjutnya, melalui serangkaian teknik rekayasa, protein yang berhasil diisolasi diharapkan dapat memacu respon imun hewan coba sehingga dapat digunakan untuk memprediksi hasil *fertility control* hewan liar dengan metode imunokontrasepsi.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan selama 10 bulan, dari bulan Februari sampai November 2010. Hewan uji untuk penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus L.*) strain BALB/c, betina, virgin dengan rerata berat badan 28 gram. Mencit dipelihara dalam kondisi laboratorium yang terkontrol dengan makan dan minum diberikan secara *ad libitum* (sesuai metode Lloyd *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2004).

Penelitian dilakukan dengan serangkaian tahapan. Tahap pertama adalah mengawinkan mencit dengan cara mengabungkan empat ekor mencit betina dengan satu ekor mencit jantan. Mencit betina yang telah kawin ditandai dengan terbentuknya *vaginal plug* (sumbat vagina). Hari dimana *vaginal plug* ditemukan diasumsikan sebagai hari pertama kebuntingan (sesuai metode Lloyd *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2004). Kontrol positif pada penelitian ini dilakukan dengan sampel yang berasal dari hewan yang tidak dikawinkan, siklus estrus hewan kontrol ditentukan dengan *vaginal smears* (apus vagina).

Tahap kedua adalah pemeliharaan mencit yang telah kawin. Mencit yang telah kawin atau yang telah ditentukan fase estrusnya dipisahkan dan dipelihara dalam kandang soliter. Pengambilan sampel uterus mencit yang bunting dilakukan pada hari kebuntingan 1, 2, 3, 4, 5, setiap jam 8 pagi, sedangkan pada mencit kontrol positif dilakukan isolasi pada hari pertama sampai kelima setelah estrus. Isolasi uterus dilakukan setelah hewan uji dibunuh dengan cara dislokasi leher. Selanjutnya dilakukan *sectio* (pembedahan) daerah abdomen dan dilakukan isolasi uterus secara keseluruhan. Uterus yang telah diisolasi disimpan pada -20 °C sampai elektroforesis dilakukan.

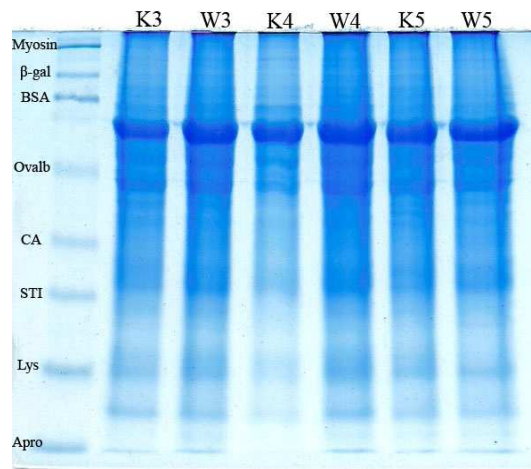
Tahap terakhir adalah elektroforesis, dilakukan dengan komposisi larutan dan protein standard sesuai dengan manual produk Bio-Rad. Sampel dihomogenisasi dengan larutan PBS (*Phosphate Buffer Solution*) selanjutnya dilakukan sentrifugasi bertahap. Sentrifugasi pertama dilakukan dengan kecepatan 700g selama 10 menit pada suhu kamar, sedangkan sentrifugasi kedua dilakukan dengan kecepatan 10000g selama 4 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang terbentuk diambil untuk dilakukan pengukuran kandungan protein menggunakan Spektrofotometer UV

dengan $\lambda 280$ dan $\lambda 260$. *Separating gel* elektroforesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi 12%, sedangkan konsentrasi *stacking gel* adalah 3%. *Loading* sampel dilakukan dengan jumlah 20 μL sedangkan protein standard dilakukan dengan jumlah 6 μL . *Running* dilakukan selama 75 menit dengan kuat arus 60 mA dan tegangan 125 volt. *Staining* (pewarnaan) gel dilakukan selama 1 malam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis protein uterus dari hari ke-3 sampai dengan ke-5 kebuntingan disajikan pada Gambar 1. Meskipun protein diisolasi dari kebuntingan hari pertama sampai hari ke-5, hasil yang disajikan dalam penelitian ini merupakan sasaran utama karena implantasi embrio mencit menurut Johnson dan Everitt (1998) terjadi pada hari ke-4 kebuntingan.

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa protein marker (*standard*) terseparasi dengan sempurna. Hal tersebut menggambarkan bahwa prosedur elektroforesis sudah benar karena protein marker sudah terseparasi dengan sempurna, yaitu secara berurutan dari berat molekul yang ringan : myosin, β -galactosidase, Bovine Serum Albumin, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase, Lysin, dan Aprotinin. Berbeda dengan protein marker, protein sampel yang berasal dari hewan kontrol maupun yang dikawinkan dengan usia 3 sampai 5 hari menunjukkan *band* yang sama, tidak ada perbedaan. *Band* protein yang sama untuk semua sampel, baik hewan yang dikawinkan maupun kontrol, diduga karena selisih waktu pengambilan sampel yang cukup jauh yaitu satu hari. Selisih waktu yang demikian kemungkinan tidak mampu mendapatkan protein target, yang diduga berperan kuat dalam proses implantasi embrio mencit.



Gambar 1. Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE 12 %

Ket .: K : Hewan kontrol ; W: Hewan dikawinkan, dengan umur kebuntingan 3,4 dan 5 hari; Protein Standard terdiri Myosin; β -Gal : β -galaktosidase; BSA : Bovine Serum Albumin; Ovalb : Ovalbumin; CA = Carbonic Anhydrase; STI : Soybean Tripsin Inhibitor ; Lys : Lysin ; Apro : Aprotinin

Implantasi merupakan proses yang penting dalam keberhasilan reproduksi pada hewan atau manusia (Ganong, 2003; Babayan *et al.*, 2008; Chedrese, 2009; Van Mourik *et al.*, 2009). Proses ini berlangsung melalui serangkaian tahapan yang rumit, melibatkan interaksi antara embrio dalam bentuk blastokista dengan endometrium uterus (Simona *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006) serta berlangsung pada waktu dan tempat yang tepat (Duc-Goiran *et al.*, 2003; Chedrese, 2009). Hasil akhir dari proses implantasi adalah invasi blastokista pada jaringan maternal untuk memperoleh nutrisi esensial bagi kehidupan dan perkembangannya (Duc-Goiran *et al.*, 2003; Van Mourik *et al.*, 2009).

Proses implantasi berlangsung dalam beberapa tahap yang sangat terkoordinasi, yaitu aposisi, adhesi dan invasi trofoblas (Simona *et al.*, 2004; Van Mourik *et al.*, 2009). Keseluruhan proses ini berlangsung dalam waktu yang sangat singkat yang disebut periode "window implantation" (Duc-Goiran *et al.*, 2003; Simona *et*

al., 2004; Van Mourik *et al.*, 2009). Aposisi merupakan proses orientasi embrio dalam lumen uterus, adhesi merupakan proses perlekatan blastokista pada dinding endometrium uterus, sedangkan invasi merupakan proses yang memungkinkan trofoblas embrionik melakukan penetrasi ke dalam desidua maternal (Blakenship *et al.*, 1993 dalam Simona *et al.*, 2004; Van Mourik *et al.*, 2009).

Seluruh tahapan proses implantasi merupakan proses yang melibatkan interaksi embrio dengan dinding endometrium uterus yang melibatkan molekul sinyal endokrin, parakrin dan otokrin (Cross *et al.*, 1994 dalam Simona *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004; Van Mourik *et al.*, 2009). Komunikasi dua arah antara blastokista dan endometrium merupakan kunci keberhasilan implantasi (Cavagna and Mantese, 2003 dalam Van Mourik *et al.*, 2009). Interaksi antara embrio dan endometrium uterus induk yang terjadi selama proses implantasi ini merupakan hasil regulasi hormon, terutama hormon estrogen dan progesteron (Yang *et al.*, 2004; Simona *et al.*, 2004; Chedrese, 2009; Van Mourik *et al.*, 2009).

Beberapa komponen yang berperan dalam proses implantasi diantaranya sitokin, *adhesion molecules* (Giudice, 1999; Inan *et al.*, 2004;), enzim proteolitik (Bulletti *et al.*, 2005) serta *growth factor* (Lim dan Dey, 2009). Integrin dan fibronektin (Inan *et al.*, 2004), trophinin, tastin dan blystin adalah molekul adhesi yang diekspresikan baik pada blastosis dan endometrium uterus dan diyakini berperan dalam proses implantasi (Nakayama *et al.*, 2009). Penelitian pada tikus yang dilakukan Yuan *et al.* (2009) menunjukkan bahwa *regulatory protein* yang diekspresikan saat implantasi adalah *heat shock protein 105 (hsp105)*. Berat molekul komponen tersebut bervariasi dari 100 – 400 kDa (Inan, 2004; Bulletti *et al.*, 2005; Jia-Rong *et al.*, 2009; Lim dan Dey, 2009; Nakayama *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009) sehingga secara teori dapat terdeteksi dalam elektroforesis.

Molekul-molekul tersebut merupakan protein fungsional mengaktifasi sinyal dalam sel selama proses implantasi berlangsung (Devlin, 2011). Protein fungsional yang mengatur proses biologis tertentu dikenal dengan istilah *regulatory protein*. *Regulatory protein* merupakan protein

yang umumnya terekspresi pada waktu yang singkat dan dengan *withdrawl* yang cepat (Naz *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). Devlin (2011) menyatakan bahwa *regulatory protein* secara kualitatif disekresi bergantung pada kebutuhan atau situasi internal sel atau organisme. Dengan demikian, selisih waktu pengambilan sampel pada penelitian ini kemungkinan menjadi penyebab protein sasaran telah hilang dan tidak diekspresikan lagi, sehingga tidak muncul *band* dalam gel elektroforesis.

Regulatory protein yang disekresikan saat implantasi dapat digolongkan sebagai *signalling protein* (Krauss, 2005; Devlin, 2011). *Signalling protein* dalam proses implantasi merupakan protein yang berperan dalam proses adhesi sel melalui aktivasi sinyal dalam sel (Krauss, 2005). Protein tersebut disekresikan dalam jumlah yang kecil, dengan jumlah bervariasi bergantung pada perbedaan ukuran dan kelarutan relatif dalam air (Devlin, 2011). Berpedoman pada hal tersebut maka kemungkinan penyebab kedua ketidakhadiran *band* dalam gel elektroforesis adalah kandungan protein yang kecil dalam sampel yang diisolasi.

Penelitian tahap awal ini belum dapat mengisolasi protein target yang diinginkan sehingga penelitian lanjutan tetap dilakukan. Berpedoman pada hasil penelitian ini maka penelitian lanjutan akan dilakukan dengan interval pengambilan sampel yang lebih dekat (sekitar 3 jam) dan *loading* sampel pada gel elektroforesis dilakukan dengan konsentrasi protein yang lebih tinggi. Dengan modifikasi metode ini diharapkan protein target dapat ditemukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti menyampaikan terima kasih atas dukungan dana melalui Hibah Penelitian Multi Tahun (Desentralisasi) Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (DP2M Dirjen Dikti Tahun Anggaran 2010. No. 2466/H7.P/KP/2010. 21 April 2010.

DAFTAR PUSTAKA

Babayan, A., A. Neuer, S. Dieterle, A. M. Bongiovanni, and S. S. Witkin, 2006. Hyaluronan in follicular fluid and embryo

- implantation following in vitro fertilization and embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 25(9-10): 473–476.
- Bowen, R.A., 2008. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal Reproduction Science* 105 : 139 – 143.
- Bulleti, C., C. Flamingi, D. de Ziegler, 2005. Implantation markers and endometriosis. *Reprod Biomed Online* 11 (4) : 464 – 468.
- Carson, D.D., I. Bagchi, S.K. Dey, A.C. Enders, A.T. Fazleabas, B.A. Lessey, dan K. Yoshinaga. 2000. Review : Embryo Implantation. *Dvel. Biol.* 223 : 217 – 237.
- Chedrese, P.J. 2009. Reproductive Endocrinology. A Molecular Approach. Springer. Pp. 35 – 53.
- Cowan, P. E. dan H.T. Biscoe. 1997. Australian and New Zealand Mammal Species Considered. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 27 - 36.
- Cross, J.C. 2002. Transcription Factors Underlying The Development and Endocrine Functions of the Placenta. *Recent. Prog. Horm. Res.* 57 : 221 – 234.
- Delves, P.J., T. Lund, dan I.M. Roitt. 2002. Antifertility Vaccines. *Trends in immunology.* 23 : 213 – 219.
- Devlin, Thomas M., 2011. Textbook of Biochemistry. With Clinical Correlations. John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Duc-Goiran, P. T. M. Mignot, C. Bourgeois and F. Ferre, 1999. Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *European Journal of Obstetrics & Gynaecology and Reproductive Biology.* Vol 83 : 85 – 100.
- Ferro, V.A. 2002. Current Advances in Antifertility Vaccines for Fertility Control and Noncontraceptive Application. *Expert Review of Vaccines.* 1 : 443 – 452.
- Ganong, W.F. 2003. Review of Medical Physiology. 21 Ed. McGraw Hill Book. Boston.
- Giudice, C. Linda, 1999. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum. Rep.* Vol. 14 (2) : 3 – 16.
- Hardy, K., dan S. Spanos. 2002. Growth Factor Expression and Function in the Human and Mouse Preimplantation Embryo. *J. Endo.* 172 : 221 – 236.
- Hardy, C.M., G. Clysdale, dan K.J. Mobbs. 2004. Development of the Mouse-Specific Contraceptive Vaccines : Infertility in Mice Immunized with Peptide and Polyepitope Antigens. *Reprod.* 128 : 395 – 407.
- Holland, M.K., J. Andrews, H. Clarke, C. Wayton dan L.A. Hinds. 1997. Selection of Antigens for Use in a Virus-vectored Immunocontraceptive Vaccine : PH-20 as a case study. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 117-24.
- Hu, Wenwei, F. Zhaohui, K. T. Angelika dan A.J. Levine. 2007. p53 Regulates Maternal Reproduction Through LIF. *Nature.* 450 : 721 – 724.
- Inan, S., G. Giray, H.S. Vatansever, K. Ozbiligin, N.K. Kuscü and S. Sayhan, 2004. Immunolocalization of Integrin and Fibronectin in Tubal Pregnancy. *Acta Histochemia.* Vol. 10 (3) : 235 – 243.
- Jia-Rong, Z., L. Shuang-di, and W Xiao-ping, 2009. Eutopic or Ectopic Pregnancy: A Competition between Signals Derived from the Endometrium and the Fallopian Tube for Blastocyst Implantation. Original Research Article *Placenta.* Vol 30 (10) : 835-839
- Krauss, G., 2003. Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. 3rd Completely Revised Edition. Wiley-VCH. Germany.
- Lim, H.J. dan S.K. Dey, 2009. HB-EGF: A unique mediator of embryo-uterine interactions during implantation. Review Article. *Exp Cell Res.* Vol 315 (4) : 619 – 626.
- Lloyd, M.L., G. R. Shellam, J.M. Papadimitriou, dan M. A. Lawson. 2003. Immunocontraception is Induced in BALB/c Mice Inoculated with Murine Cytomegalovirus Expressing Mouse Zona Pellucida 3. *Biolreprod.* 68 : 2024 – 2032.
- Martin, B.J., M.A. Suckow, W.R. Wolter, T. Berger, and J.W. Turner Jr., 2006. Use of mucosal immunization with porcine zona pellucida (PZP) in mice and rabbits.

- Animal Reproduction Science* 93 : 372–378.
- Nakayama, J., D. Aoki, T. Suga, T.O. Akama, S. Ishizone, H. Yamaguchi, K. Imakawa, D. Nadano, A.T. Fazleabas, T. Katsuyama, S. Nozawa, M.N. Fukuda, 2003. Implantation-Dependent Expression of Trophinin by Maternal Fallopian Tube Epithelia during Tubal Pregnancies: Possible Role of Human Chorionic Gonadotrophin on Ectopic Pregnancy. Original Research Article. *The American Journal of Pathology*, Vol. 163 (6): 2211-2219.
- Naz, R.K., S.K. Gupta, J.C. Gupta, H.K. Vyas, dan G.P. Talwar. 2005. Recent advances in Contraceptive Development : A Mini Review. *Human Reproduction*. 20 (12) : 3271 – 3283.
- Nie, Gui-Ying, Anna R. Butt, L.A. Salamonsen, dan J.K. Findlay. 1997. Hormonal and Non Hormonal Agents at Implantation as Targets for Contraception. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 65 – 76.
- Norwitz, E.R., D.J. Schucst, dan S.J. Fisher. 2001. Implantation and the Survival of Early Pregnancy. *N. Engl. J. Med.* 345 : 1400 – 1408.
- Paria, B.C., J. Reece, S.K. Das, dan S.K. Dey. 2002. Deciphering the Cross-talk of Implantation : advances and challenges. *Science*. 296 : 2185 – 2188.
- Ramsay, A.J., and I.A. Ramshaw, 1997. Cytokine enhancement of immune responses important for immunocontraception. *Reprod. Fertil. Steril.* 9 : 91 – 97
- Robinson, A.J., R. Jackson, P. Kerr, J. Merchant, I. Parer dan R. Pech. 1997. Progress Toward Using Recombinant Myxoma Virus as Vector for Fertility Control in Rabbits. *Reprod. Fertil. Dev.* 9 : 77 - 83.
- Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male, 2005. Immunology. 3rd Ed. Mosby Year Book Europe Ltd. London.
- Simona, C., C. Morenoa, J. Remohía, and A. Pellicera, 1998. Cytokines and embryo implantation 1. *J.Repr.Immun.* 39 : 117 – 131.
- Smith, G., A. Walmsley and I. Polkinghorne, 1997. Plant-derived immunocontraceptive vaccines. *Reprod. Fertil. Steril.* 9 : 85 – 89.
- Stites, D.P., A.I. Terr, T.G. Parslow, 2002. Basic and Clinical Immunology. 8th Ed. Blackwell. Maruzen Asia. Singapore.
- Van Mourik, MSM., N.S. Macklon, and C.J. Heijnen, 2009. Embryonic implantation : cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *J. Leuk.Biol.* 85 : 000 - 000.
- Yang, Yong Jun, Yu-Jing Cao, Shu-Min Bo, Sha Peng, Wei-Min Liu and En-Kui Duan, 2006. Leptin-directed embryo implantation: Leptin regulates adhesion and outgrowth of mouse blastocysts and receptivity of endometrial epithelial cells. *Animal Reproduction Science*. 19 : 155 – 167.
- Yuan, J.X., L.J. Xiao, X.S. Zhang, T. Liu, M. Chen, Z.Y. Hu, F. Gao, and Y.X. Liu, 2009. Increased expression of heat shock protein 105 in rat uterus of early pregnancy and its significance in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* Vol. 13 : 7 – 23.