

PENGARUH PEMBERIAN ANTIBODI MONOKLONAL *HUMAN ZONA PELLUSIDA 3* (Mab *hZP3*) SEBAGAI KANDIDAT IMUNOKONTRASEPSI TERHADAP KUALITAS FOLIKEL PRE ANTRAL DAN ANTRAL PADA OVARIUM *Mus musculus*

Reny Retnaningsih¹

Program Studi Kebidanan Politeknik Kesehatan RS dr. Soepraoen

Email : renyretna87@gmail.com

ABSTRAK

Pendahuluan : Metode kontrasepsi dengan menggunakan vaksin yang saat ini sedang gencar dikembangkan adalah imunokontrasepsi. Metode kontrasepsi ini dikembangkan sebagai kontrasepsi alternatif yang aman, efektif dan reversible. Imunokontrasepsi menggunakan glikoprotein pada *zona pellusida 3* (ZP3) mamalia dapat diharapkan karena keberadaan ikatan antibodi spesifik pada antigen ZP3 yang dapat menghambat fertilitas dan tidak menimbulkan kerusakan. Target kontrasepsi adalah pencegahan terjadinya pembuahan antara sperma dan ovum yang disebut dengan fertilisasi. Tujuan penelitian untuk mengetahui pemberian antibodi monoklonal *human Zona Pellucida 3* (Mab *hZP3*) sebagai kandidat imunokontrasepsi terhadap kualitas folikel pre antral dan antral ovarium mencit *Mus musculus*.

Metode : Penelitian yang akan digunakan adalah *true experiment posttest only control group design*. Replikasi penelitian mencit sebanyak 48 ekor dan dikelompokkan menjadi 12 yaitu kontrol (adjuvan), kelompok perlakuan (Mab *hZP3* dosis 20 µg, 40 µg dan 60 µg), pengorbanan mencit masing masing kelompok dilakukan pada hari ke 10, 15 dan 20. Pengamatan kualitas folikel pre antral dan antral ovarium mencit melalui pemeriksaan hematoksilen dan eosin.

Hasil dan Diskusi : Hasil analisis deskriptif menunjukkan struktur folikel yang normal dan tidak terdapat perbedaan struktur folikel pre antral dan antral pada ovarium mencit. Hasil yang sama juga terlihat pada observasi periode waktu 10-20 hari. Hal ini terkait erat dengan spesifitas monoklonal antibodi yang dihasilkan.

Kesimpulan : Mab *hZP3* berpeluang cukup baik sebagai sediaan imunokontrasepsi bagi wanita karena aman dan tidak mengganggu proses folikulogenesis.

Kata Kunci : *Monoklonal antibody*, ovarium, folikel pre antral dan antral

PENDAHULUAN

Masalah kependudukan di Indonesia semakin tidak terkendali dari tahun ke tahun. Survey tahun 2010 menunjukkan Indonesia memiliki jumlah penduduk yang sangat besar yang mencapai angka 237,6 juta jiwa, hal ini menempatkan Indonesia sebagai negara dengan penduduk paling banyak nomor 4 dunia. Hasil survey tahun 2010 terjadi kenaikan 13,2%, perkiraan 5 tahun ke depan terjadi kenaikan 6,6% sehingga mencapai 255,5 juta jiwa. Laju pertumbuhan penduduk sangat penting untuk dikendalikan, oleh karena itu diperlukan peran suatu kontrasepsi. Agar dapat mencapai hal tersebut, maka dibuatlah beberapa cara atau alternatif untuk mencegah ataupun menunda kehamilan. Dikembangkan kontrasepsi yang reversibel, aman dan efektif sehingga bisa menekan fertilisasi dan menurunkan angka

Fertility Rate. Berdasarkan data BKKBN (2012) menyebutkan bahwa kontrasepsi yang digunakan di Indonesia saat ini adalah kontrasepsi hormonal meliputi kontrasepsi pil kombinasi dan suntik DMPA. Namun, kontrasepsi tersebut masih memiliki beberapa kekurangan khususnya terkait dengan efek samping dan kembalinya siklus hormonal. Kontrasepsi dengan menggunakan IUD juga memiliki efek samping, antara lain perdarahan lebih banyak dan nyeri saat menstruasi (Prawirohadjo, 2011). Berbagai efek samping yang ada tentunya menyebabkan ketidaknyamanan pengguna (akseptor) kontrasepsi dan butuh adanya pengembangan metode kontrasepsi yang aman dan minim efek samping.

Untuk mencari alternatif pilihan berbagai macam cara kontrasepsi, telah dikembangkan

penelitian tentang vaksin kontrasepsi. Metode kontrasepsi dengan menggunakan vaksin yang saat ini sedang gencar dikembangkan adalah imunokontrasepsi. Imunokontrasepsi menggunakan glikoprotein pada zona pellusida 3 (ZP3) mamalia dapat diharapkan karena keberadaan ikatan antibodi spesifik pada antigen ZP3 yang dapat menghambat fertilitas dan tidak menimbulkan kerusakan (Widodo, *et.al.*, 2005). Target kontrasepsi adalah pencegahan terjadinya pembuahan antara sperma dan ovum yang disebut dengan fertilisasi (Mustofa, 2012). Ada beberapa peristiwa penting dalam proses fertilisasi ini, yaitu pengikatan sperma ke zona pelusida (ZP) dan menginduksi reaksi akrosom. Rankin *et al.*, 2007 menjelaskan bahwa ZP memainkan peran penting dalam pengembangan oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio awal. ZP juga berperan sebagai reseptor primer pengenalan sperma dan menjadi dasar untuk mengembangkan antibodi sehingga menjadi sangat potensial untuk diteliti dan dikembangkan sebagai vaksin kontrasepsi.

Penelitian Pantiwati (2012) dengan memberikan imunisasi pasif anti *bZP3* pada mencit didapatkan hasil titer antibodi paling tinggi ditemukan pada mencit yang diinkubasi selama 63 hari sehingga mampu menekan fertilisasi. Mustofa (2005), penelitian ini dilakukan pada mencit yang diberikan imunisasi ZP3 dari kambing (*gZP3*). Hasilnya menunjukkan tidak ada kelainan pada ovarium dan folikel, dan antara kelompok kontrol dan perlakuan tidak ada perbedaan pada jumlah folikel primordial, primer, sekunder dan de graff. Berbeda halnya dengan penelitian Calongos, *et.al.*, (2009) dalam penelitiannya menggunakan antibodi anti-ZP3 menunjukkan ukuran folikel dan antrum yang lebih kecil dari normal, pada kultur folikel yang diberikan anti ZP3, sel granulosa tidak sempurna melekat pada oosit dan mengakibatkan ekstruksi oosit. Hasil yang sama ditunjukkan penelitian Paterson, *et.al.*, (2002) dalam penelitiannya dengan memberikan imunisasi aktif *hZP3* pada Marmoset (*Callithrix jaccus*) menyebabkan gangguan fungsi ovarium berupa hambatan folikulogenesis dan percepatan penurunan jumlah folikel primordial yang *irreversible*. Namun, masih sedikit sekali data yang terkait antigen ZP3 manusia yang disebabkan oleh terbatasnya ketersediaan oosit manusia untuk penelitian (Patterson, *et al*, 2008). Oleh karena

itu, mendorong Mubarakati *et al*, (2014) mengembangkan antibodi monoklonal *human* Zona Pelusida 3 (Mab *hZP3*) yang berasal dari serum darah manusia sebagai calon imunokontrasepsi yang potensial.

MATERIAL DAN METODE

Mencit

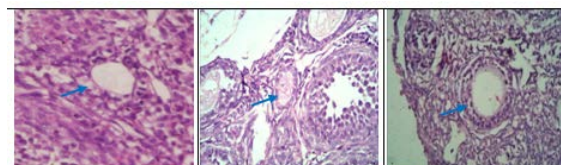
Mencit yang pernah melahirkan dengan bobot 20-25 gram dilakukan aklimatisasi dan sinkronisasi selama 3 minggu. Mencit di random dalam 12 kelompok dengan pembagian kelompok kontrol (Injeksi 50 μ L Adjuvant $Al(OH)_3$ + 50 μ L Tris Hcl), kelompok perlakuan (Injeksi mAb *hZP3* dosis 20 μ g, 40 μ g dan 60 μ g). Setiap kelompok dikorbankan berdasarkan siklus pro estrus ke-2, ke-3 dan ke-4.

Pengamatan Kualitas Folikel Pre Antral dan Antral

Ovarium diambil dan dilakukan pemeriksaan histopatologis hematoxilin dan eosin (HE), selanjutnya diidentifikasi jenis folikel untuk pengamatan kualitas folikel pre antral dan antral.

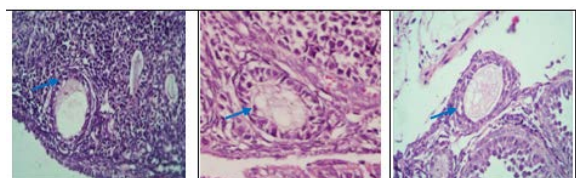
HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

Karakteristik Folikel Pre Antral Folikel Primer



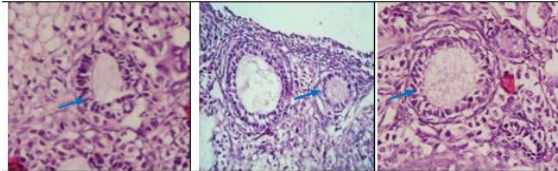
Gambar 1 Gambaran folikel primer pada kelompok kontrol (K1,K2,K3) yang di terminasi hari ke 10, 15 dan 20.

Terlihat pada gambar adanya folikel primer yang normal dengan satu lapis sel kubus yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel dengan posisi sentris, membran basal tampak tipis, tidak terlihat adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda warna biru).



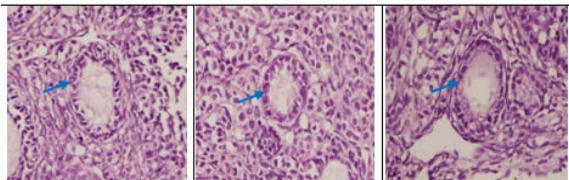
Gambar 2 Gambaran folikel primer pada kelompok perlakuan (K4,K5,K6) yang di injeksi Mab-hZP3 20 µg.

Terlihat pada gambar adanya folikel primer yang normal dengan satu lapis sel kubus yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel dengan posisi sentris, membran basal tampak tipis, tidak terlihat adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda warna biru).



Gambar 3 Gambaran folikel primer pada kelompok perla kuan (K7, K8, K9) yang di injeksi Mab-hZP3 40 µg.

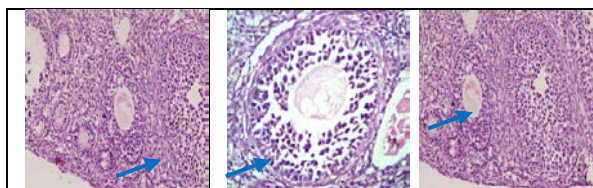
Terlihat pada gambar adanya folikel primer yang normal dengan satu lapis sel kubus yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel dengan posisi sentris, membran basal tampak tipis, tidak terlihat adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda warna biru).



Gambar 4 Gambaran folikel primer pada kelompok perla kuan (K10, K11, K12) yang di injeksi Mab-hZP3 60 µg.

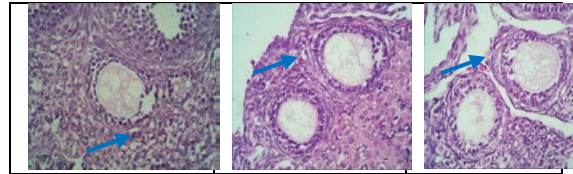
Terlihat pada gambar adanya folikel primer yang normal dengan satu lapis sel kubus yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel dengan posisi sentris, membran basal tampak tipis, tidak terlihat adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan ana plasia (tanda warna biru).

Folikel Sekunder



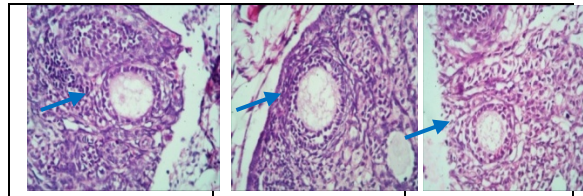
Gambar 5 Gambaran folikel sekunder pada kelompok kontrol (K1, K2, K3) yang di injeksi 50 µl Al(OH)₃ + 50 µl Tris HCL.

Terlihat pada gambar ada nya folikel sekundyang normal dengan dua atau lebih lapis sel granulosa yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel posisi sentris, membran basal tampak menebal, tidak tampak adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda warna biru).



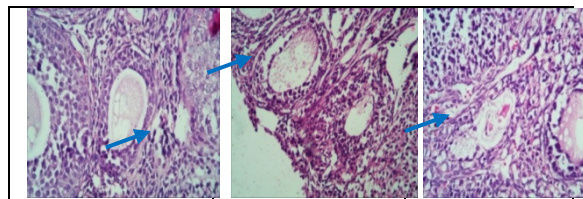
Gambar 6 Gambaran folikel sekunder pada kelompok perlakuan (K4, K5, K6) yang di injeksi Mab-hZP3 20 µg.

Terlihat pada gambar adanya folikel sekundyang normal dengan dua atau lebih lapis sel granulosa yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel posisi sentris, membran basal tampak menebal, tidak tampak adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda warna biru).



Gambar 7 Gambaran folikel sekunder pada kelompok perlakuan (K7, K8, K9) yang di injeksi Mab-hZP3 40 µg.

Terlihat pada gambar adanya folikel sekunder yang normal dengan dua atau lebih lapis sel granulosa yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel posisi sentris, membran basal tampak menebal, tidak tampak adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, meta plasia dan anaplasia (tanda warna biru).

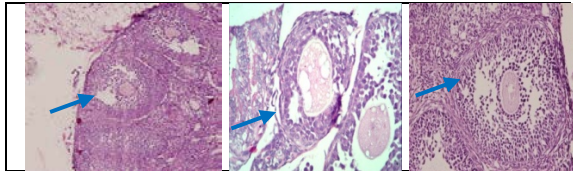


Gambar 8 Gambaran folikel sekunder pada kelompok perlakuan (K10, K11, K12) yang di injeksi Mab-hZP3 60 µg.

Terlihat pada gambar adanya folikel sekundyang normal dengan dua atau lebih

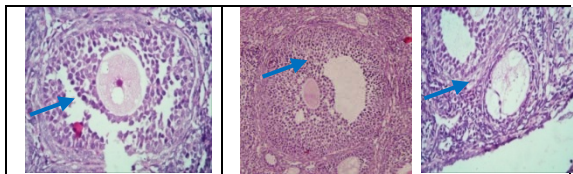
lapis sel granulosa yang mengelilingi oosit, tampak adanya inti sel posisi sentris, membran basal tampak menebal, tidak tampak adanya sel radang, tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda panah warna biru).

Karakteristik Folikel Antral Folikel Tersier



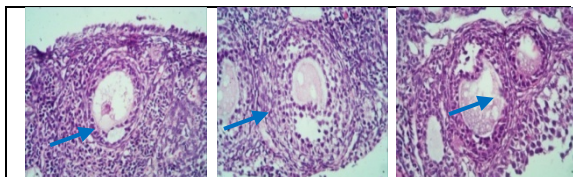
Gambar 9 Gambaran folikel tersier pada kelompok kontrol (K1, K2, K3) yang di injeksi 50 μ l Al(OH)₃ + 50 μ l Tris HCL.

Terlihat pada gambar adanya folikel tersier yang normal dengan tampak adanya antrum folikuli, liquor folikuli, tampak adanya inti sel posisi sentris mulai bergeser ke tepi, membran basal menebal, tidak tampak sel radang, tampak adanya sel teka eksterna dan interna tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda panah warna biru).



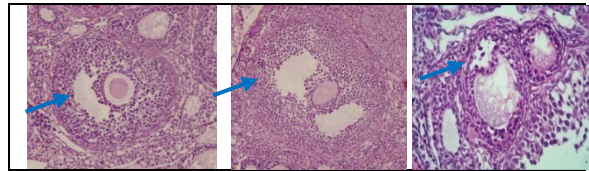
Gambar 10 Gambaran folikel tersier pada kelompok perlakuan (K4, K5, K6) yang di injeksi Mab-hZP3 20 μ g.

Terlihat pada gambar adanya folikel tersier yang normal dengan tampak adanya antrum folikuli, liquor folikuli, tampak adanya inti sel posisi sentris mulai bergeser ke tepi, membran basal menebal, tidak tampak sel radang, tampak adanya sel teka eksterna dan interna tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda panah warna biru)



Gambar 11 Gambaran folikel tersier pada kelompok perlakuan (K7, K8, K9) yang di injeksi Mab-hZP3 40 μ g.

Terlihat pada gambar adanya folikel tersier yang normal dengan tampak adanya antrum folikuli, liquor folikuli, tampak adanya inti sel posisi sentris mulai bergeser ke tepi, membran basal menebal, tidak tampak sel radang, tampak adanya sel teka eksterna dan interna tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda panah warna biru)



Gambar 12 Gambaran folikel tersier pada kelompok perlakuan (K10, K11, K12) yang di injeksi Mab-hZP3 60 μ g.

Terlihat pada gambar adanya folikel tersier yang normal dengan tampak adanya antrum folikuli, liquor folikuli, tampak adanya inti sel posisi sentris mulai bergeser ke tepi, membran basal menebal, tidak tampak sel radang, tampak adanya sel teka eksterna dan interna tidak tampak sel yang mengalami nekrosis, metaplasia dan anaplasia (tanda panah warna biru)

PEMBAHASAN

Pengaruh Mab-hZP3 Berbagai Dosis terhadap Kualitas Folikel Pre Antral

Hasil penelitian menunjukkan struktur fungsional ovarium pada folikel pre antral dan antral yang dinyatakan dengan kualitas folikel primer, sekunder dan tersier masing-masing hewan coba setelah diberikan perlakuan baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan tidak menunjukkan adanya kerusakan pada struktur fungsional ovarium.

Data tersebut menunjukkan, bahwa pemberian Mab-hZP3 dalam adjuvant Al(OH)₃ tidak memberikan kelainan ovarium pada berbagai dosis dan waktu pengamatan. Mustofa et al., (2005) dengan memberikan imunisasi gZP3 pada mencit menunjukkan gambaran histologis ovarium kelompok perlakuan yang tidak berbeda dengan kontrol mengindikasikan tidak adanya gangguan folikulogenesis, yang selanjutnya tidak menyebabkan perubahan profil endokrin reproduksi dan tidak mempengaruhi siklus birahi.

Menurut Paterson et al. (1999) dan Paterson et al. (2002) terjadinya patologi ovarium setelah

penggunaan imunokontrasepsi ditandai dengan gangguan folikulogenesis dan pengosongan folikel primordial. Gangguan fungsi ovarium akibat imunisasi dengan sediaan zona pelusida tergantung beberapa faktor yaitu kemurnian antigen, suseptibilitas hewan coba, adjuvan dan keberadaan epitop sel T pada sediaan zona pelusida yang dipakai sebagai imunogen.

Perbedaan dosis Mab-hZP3 tidak mempengaruhi jumlah folikel pre antral kelompok pengamatan. Penelitian Mustofa *et al.*, (2005) dengan memberikan imunisasi gZP3 pada mencit dengan dosis 20 µg dan 40 µg dalam Freund's adjuvant dengan dua kali booster. Hasilnya menunjukkan tidak ada kelainan pada ovarium dan folikel. Pada penelitiannya menunjukkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak ada perbedaan pada jumlah folikel primordial, primer, sekunder, tersier dan de graff. Hal ini dapat disamakan dengan penelitian East *et al* (1985) yang menunjukkan bahwa antibodi monoklonal mZP3 dengan jumlah mikrogram mampu menghambat fertilisasi in vivo dan in vitro. Penelitian sebelumnya juga telah membuktikan bahwa antibodi monoklonal mZP3 tidak mengganggu perkembangan folikel dan embrio. Rerata jumlah folikel kecil, sedang dan besar adalah sama (East *et al*, 1984). Hal ini dapat diartikan, folikel primer dapat berkembang menjadi folikel sekunder yang menunjukkan bahwa rekrutmen dan proliferasi folikel berjalan sempurna.

Pengaruh Mab-hZP3 terhadap kuantitas folikel antral

Penelitian ini melaporkan pengaruh pemberian Mab-hZP terhadap perkembangan folikel yang dikhususkan pada folikel antral. Hasil penelitian menunjukkan tidak adanya pengaruh pemberian antibodi monoklonal hZP3 terhadap kualitas folikel antral. Sama halnya dengan pendapat diatas, bahwa spesifisitas antibodi tidak berpengaruh pada perkembangan folikel. Tingkat spesifitas yang tinggi tidak akan menimbulkan *cross reaction* sehingga meminimalkan reaksi inflamasi (Abbas *et al*, 2014). Berdasarkan histogram pengaruh interaksi Mab-hZP3 berbagai dosis dengan waktu pengamatan terhadap jumlah folikel antral, ditunjukkan bahwa kelompok kontrol dan pemberian Mab-hZP3 berbagai dosis memiliki rata-rata jumlah folikel antral relatif sama. Dari pengujian ini terbukti bahwa

pemberian Mab-hZP3 berbagai dosis pada berbagai waktu pengamatan, tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap jumlah folikel antral.

Hasil pada penelitian berbeda dengan penelitian lain yang dilakukan Calongos *et al.*, (2009) pada penelitiannya secara in vitro dengan menambahkan antibodi ZP2 dan ZP3 pada kultur folikel mencit mendapatkan bukti bahwa hal ini menyebabkan gangguan pembentukan folikel antral. Rerata pembentukan folikel antral lebih rendah baik pada perlakuan dengan antibodi ZP3 (68,3%) maupun dengan antibodi ZP2 (63,3%) dibandingkan dengan kontrol (93,3%). Akan tetapi pada penelitian Mustofa *et al.*, (2005) dengan memberikan imunisasi gZP3 pada mencit dengan dosis 20 µg dan 40 µg dalam Freund's adjuvant dengan dua kali booster. Hasilnya menunjukkan tidak ada kelainan pada ovarium dan folikel. Pada penelitiannya menunjukkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan tidak ada perbedaan pada kualitas folikel primordial, primer, sekunder, tersier dan de graff.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian Mab-hZP3 tidak berpengaruh terhadap kualitas folikel pre antral dan antral pada ovarium mencit (*Mus musculus*) pada berbagai dosis dan waktu.

Saran

Masih perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh Mab hZP3 dengan waktu pengamatan yang lebih panjang terhadap tingkat fertilitasnya. Masih perlunya dilakukan penelitian lebih mendalam tentang folikulogenesis khususnya tentang adanya apoptosis sel dan histology oosit setelah diberikan Mab-hZP3.

DAFTAR RUJUKAN

- Abbas, A.K and Lichtman, A.H. 2011. *Basic Immunology*. Edisi 3. WB Saunders Company. Philadelphia.
- Abbas, A.K., Lichtman, A.H and Pillai, S. 2014. *Basic Immunology: Functions and Disorders of The Immune System*. Fourth Edition.Elsevier Inc.

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H and Pillai, S. 2015. *Cellular and Molecular Immunology*. Eighth Edition. Elsevier Inc.
- Aitken, R.J., Paterson, M., Jennings, Z.A., Wilson, M.R. 2002. *The Contraceptive Potensial of ZP3 and ZP3 Peptide in a Primate Model*. Journal of Reproductive Immunology. 53 : 99 – 107.
- BKKBN. 2013. *Profil Kesehatan Indonesia 2012*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Calongos, G., Hasegawa, A., Komori, S and Koyama, K. 2009. *Harmful Effects of Anti-Zona Pellucida Antibodies in Folliculogenesis, Oogenesis, and fertilization*. Journal of Reproductive Immunology 79: 148–155.
- Cunningham, F.G., Leveno, K.J., Bloom, S.L., Hauth, J.C., Rouse, D.J. 2010. *Williams Obstetrics*. Setia R (editor), 23ed. Pendit U.(penerjemah). 2013. *Obstetri Williams*. Edisi 23. Jakarta : EGC.
- Dahlan, Sopiudin. 2013. *Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan. Deskriptif, Bivariat dan Multivariat. Dilengkapi Aplikasi Dengan Menggunakan SPSS*. Salemba Medika. Jakarta.
- Dong, J., Albertini, D.F., Inshimori, K., Kumar, T.R., Lu, N & Matzuk, M.M. 1996. Growth Differentiation Factor-9 is required during Early Ovarian Folliculogenesis. *Abstract Nature Publishing Group* (383): 531-535.
- Dube, J.L., P.Wang., J.Elvin., K.M.Lyons., A.J. Celest., & M.M matzuk. 1998. *The Bone Morphogenetic Protein-15 Gene Is X-Linked and Expressed on Oocytes*. Molec.Endocr.
- East, I.J., Gulyas, B.J., and Dean, J., 1985. *Monoclonal antibodies to the murine zona pellucida protein with sperm receptor activity : effects on fertilization and early development*. Journal Developmental Biology.
- Gode Funda, M.D., Bulent Gulekli, M.D., Erbil Dogan, M.D., Peyda Korhan, Seda Dogan, Ozgur Bige, M.D., a Dilek Cimrin, M.D., c and Nese Atabey,. 2011. *Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality*. Fertility and Sterility. American Society for Reproductive Medicine
- Gruijters, J.G., Visser, J.A., Durlinger, A.L.L., Themmen. 2003. *Anti Mullerian Hormone : Function and Molecular Mechanism of Action in the Ovary*, Molecular and Cellular Endocrinology.
- Gupta, S.K and Bhandari, B. 2011. *Acrosome Reaction: Relevance of Zona Pellucida Glycoproteins*. Asian Journal of Andrology 13: 79-105.
- Koyama, K., and Hasegawa, A., 2006. *Premature Ovarian Failure Syndrome maybe induced by autoimmune reactions to zona pellucid proteins*. Journal fur Reproduktionsmedizin und Endokrinologie- Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology.
- Kusriningrum, R.S. 2008. *Perancangan Percobaan*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Lailiya, I.L., Rahayu, S., Pradini, W.A., Ciptadi, G, 2014. *Analisis Polimorfisme Gen BMP-15 (Bone Morphogenetic Protein-15) dengan Metode PCR-RFLP dan Hubungannya dengan Performan Reproduksi Sapi Friesian Holstein (FH)*. Jurnal Biotropika Vol.2 No.3.
- Liao, W.X., Moore, R.K., Otsuka, F., Shimasaki, S., 2003. *Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP-15 mutant sheep*. Journal of Biological and Chemistry. 278: 3713–3719.
- Litscher, E.S., Williams, Z., Wassarman, P.M. 2009. *Zona Pellucida Glycoprotein ZP3 and fertilization in mammals*. Molecular Reproduction and Development. 76 : 933-941
- Lloyd, M.L., Papadimitriou, J.M., O’Leary, S., Robertson, S.A and Shellam, J.R. 2010. *Immunoglobulin to zonapellucida 3 mediates ovarian damage and infertility after contraceptive vaccination in mice*. Journal of Autoimmunity 35: 77-85.
- Mubarakati, N.J., Aulani’am, Sumitro, B.S., Ciptadi, Gatot. 2014. *Bovine and Human Zona Pellusida 3 Gene Glycans Site Prediction Using In Silico Analysis*. The

- Journal of Tropical Life Science. 4 : 206-209.
- Mubarakati, N.J., Aulanni'am., Sumitro, S.B., Ciptadi, G. 2015. *Immunogenicity and Characterization of Antibodies Against to Recombinant human ZP3 for Development Woman Immunocontraception*. Biosciences Biotechnology Research.
- Mustofa, Imam. 2005. *Identifikasi Efek Samping Imunokontrasepsi Zona Pellusida 3 Kambing pada Histologi Ovarium Mencit (Mus Musculus) sebagai Model*. Media Kedokteran Hewan Vol.21, No. 1.
- Mustofa, Imam, Mahaputra, L., Dachlan, Yoes Prijatna. 2012. *Identifikasi Protein Reseptor Fertilisasi (ZP3) pada Zona Pellusida Kambing sebagai Kandidat Bahan Imunokontrasepsi dengan Teknik Fertilisasi in Vitro*. JBP Vol. 14 No. 3.
- Naz, R.K and rajesh, C. 2004. *Passive Immunization for immunocontraception : lesson learned from infectious diseases*, Frontiers in Bioscience.
- Otsuka F, Yao Z, Lee T-h, Yamamoto S, Erickson GF & Shimasaki S. 2000. *Bone Morphogenetic Protein-15. Identification of target cells and biological functions*. Journal of Biological Chemistry. 275
- Palma, G.A., Arganaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.A., and Sinowatz, F., 2012. *Biology ang Biotechnology of Follicle Development* . The Scientific World Journal.
- Pandey, S. 2010. *Hybridoma Technology for Production of Monoclonal Antibody*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Riview and Research 1: 88-94.
- Pantiwati, Y. 2012. *Passive Immunization of Anti bZP3 (Zona Pellusida 3) in Wistar Rat (Rattus novergicus) and Mouse (Mus Musculus)*, Media Peternakan. 1 : 163-169.
- Paterson, M., Jenings, Z.A., Van Duin, M. and Aitken, R.J. 2000. *Immunocontraception with zona pellucid proteins*, Th Netherlands Cells Tissues Organs. 166 ; 228-232.
- Prawirohardjo. 2011. *Ilmu kebidanan*. EGC : Jakarta.
- Rankin, T.,Soyal, S., Dean, J. 2000. *The mouse zona pellucida : Folliculogenesis, fertility and pre-implatation development*. Molecular and Cellular Endocrinology. 163 : 21 – 25
- Robert Van Den Hurk and Jia Zhao. 2005. *Formation of Mammalian Oocytes and Their Growth, Differentiation and Maturation Within Ovarian Follicles*. Journal of Theriogenology 63 : 1717-1751.
- Sadler, T.W. 2012. Langman's Medical Embryology. Novrianti, A. (Editor). Pendit, B.U. (Penerjemah). 2012. *Embriologi Kedokteran Langman*. Edisi 10. Jakarta : EGC.
- Sanchez, F and Smitz, J. 2012. *Molecular Control of Oogenesis*. Elsevier. *Biochimica et Biophysica Acta* (1822): 1896-1912.
- Staruss, F.J., Williams, J.C. 2014. *The Ovarian Life Cycle in Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology*, 5th ed; 213-253.
- Strauss III, J.F and Williams, C.J. 2014. *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Strauss, JFF and Barbieri, RL (editor).Seventh Edition.Elsevier Inc.
- Subowo. 2009. *Imunologi*. Sagung Seto : Jakarta.
- Widodo dan Aulanni'am. 2005. *Spesifitas Antibodi Bovine Zona Pellusida 3 (Anti-bZP3) Terhadap ZP3 Kelinci Berbasis bZP3 Sebagai Antigen Kontraseptif*. Indo. J. Chem 5 (2), 182-187.
- Wiknjosastro, H. 2012. *Anatomi Alat Kandungan*. In W.Hanafiah (ed). Ilmu Kandungan. Edisi 2. Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo. Jakarta.