

IDENTIFIKASI PROTEIN PENENTU IMPLANTASI EMBRIO PADA TIKUS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

*The Implanting Embryo Determiner Protein in Wistar Rat (*Rattus norvegicus*)*

Agung Janika Sitasiwi¹ dan Muhammad Anwar Djaelani¹

¹Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro, Semarang

E-mail: agssiwi@yahoo.co.id

ABSTRAK

Penelitian dengan tujuan mengidentifikasi protein penentu implantasi embrio pada tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) dilakukan sebagai upaya eksplorasi agen imunokontrasepsi baru untuk regulasi fertilitas hewan liar. Hewan uji yang digunakan adalah tikus Wistar betina dewasa kelamin dengan bobot badan berkisar 280-300 g. Tikus dibagi dalam dua kelompok, satu kelompok sebagai kontrol (tidak dikawinkan) sedangkan kelompok lain adalah kelompok yang dikawinkan. Tikus dipelihara dan dikawinkan dalam kondisi laboratorium yang terkontrol. Kebuntingan ditentukan dengan adanya *vaginal plug* pada tikus betina setelah dikawinkan. Protein diisolasi dari sampel uterus yang diambil pada umur kebuntingan 3-5 hari. Isolasi dan separasi protein dilakukan berdasarkan manual dan standar protein produk Bio-Rad. Hasil penelitian menunjukkan pita protein yang terekspresi pada hari ke-4 kebuntingan dengan berat molekul berkisar 45 kDa diduga *leukemia inhibitory factor*.

Kata kunci: imunokontrasepsi, implantasi, *leukemia inhibitory factor*

ABSTRACT

The purpose of this research is to identify the protein as the determiner in Wistar rat implanting embryo in order to explore a new immunocontraception agent in controlling wild animal fertility. Adult female rat with 280-300 g in weight were used as experimental animals. Rats were handled and bred under laboratory condition. The precise days of pregnancy were determined by vaginal plug occurred in female rats after mating. Protein was isolated from uterus on day 3rd to 5th of pregnancy. Protein isolation and separation were analysed by electrophoresis method based on Bio-rad manual. The research showed that the protein band produced in day 4th of rats pregnancy containing 45 kDa molecules is assumed to be *leukemia inhibitory factor*.

Key words: immunocontraception, implantation, *leukemia inhibitory factor*

PENDAHULUAN

Tikus (*Rattus rattus*), baik tikus sawah (*Rattus argentiventer*) maupun tikus rumah (*Rattus rattus diardii*) merupakan hewan liar yang memiliki potensi merugikan lebih besar dari mamalia lain. Populasi tikus yang berlebihan menyebabkan kerugian yang cukup besar, baik pada sektor pertanian maupun pada bidang kesehatan (Moore *et al.*, 1997). Kerugian dalam sektor pertanian yang disebabkan oleh populasi tikus yang berlebihan merupakan alasan utama pengembangan metode untuk mengontrol laju populasi hewan tersebut. Alasan lain pengontrolan laju reproduksi tikus adalah karena tikus merupakan reservoir dan sekaligus penyebar utama leptospirosis. Pengontrolan populasi tikus sampai saat ini dilakukan dengan pemberian racun, penembakan, pemasangan perangkap, atau dengan mengombinasikan beberapa cara tersebut. Metode pengontrolan yang telah dilakukan ternyata belum mampu untuk menekan populasi tikus secara efektif, sehingga sampai saat ini metode pengontrolan populasi tikus masih terus dikembangkan (Anonimus, 2010).

Perkembangan penelitian reproduksi dalam regulasi fertilitas hewan liar, saat ini lebih banyak diarahkan pada pembuatan vaksin dengan tujuan untuk memacu respons imun hewan target. Hal tersebut dilakukan dengan alasan metode penembakan, pemberian racun, atau perangkap dianggap kurang efektif, terutama untuk hewan liar dengan populasi yang besar dan

daerah pengembaraan yang luas (Smith *et al.*, 1997). Metode pengaturan fertilitas dengan memacu respons imun ini dikenal sebagai metode imunokontrasepsi (Delves *et al.*, 2002; Ferro, 2002).

Hardy *et al.* (2004) dan Naz *et al.* (2005) menyatakan bahwa metode imunokontrasepsi terbukti dapat digunakan untuk meregulasi fertilitas hewan liar agar hewan target memiliki respons imun secara alami sehingga regulasi fertilitas dapat berjalan secara alami pula. Kirkpatrick *et al.* (2011) menyatakan bahwa keberhasilan imunokontrasepsi telah terbukti pada 85 spesies hewan liar, baik pada tingkat individu atau pada tingkat populasi. Manajemen pada tingkat populasi dengan metode imunokontrasepsi telah terbukti pada spesies dengan daerah pengembaraan yang luas, seperti pada kuda liar, rusa liar, bison, serta gajah afrika.

Konsep imunokontrasepsi dapat dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi dan mengidentifikasi protein yang berperan penting dalam salah satu tahap proses reproduksi untuk digunakan sebagai antigen (Nie *et al.*, 1997; Bowen, 2006). Beberapa peptida telah berhasil diisolasi dalam proses reproduksi serta terbukti dapat dijadikan agen imunokontrasepsi, terutama pada tikus dan kelinci. Peptida tersebut adalah *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), 27 kDa *heat-shock protein* (HSP) plasenta, reseptor *leukemia inhibitory factor* (LIFR), glikoprotein oviduk (OGP), proliferasin (PLF), prolaktin (PRL), protein sperma (SP56), dan sub-unit zona pelusida (ZP1 dan ZP3) (Nie *et al.*, 1997; Naz *et al.*, 2005).

Beberapa molekul yang berperan dalam proses reproduksi telah dikembangkan sebagai antigen dalam metode imunokontrasepsi, diantaranya molekul pada gamet, serta molekul regulator sekresi dan target hormon reproduksi. Nie *et al.* (1997) menyatakan bahwa terdapat target baru untuk pengembangan metode imunokontrasepsi, yaitu dengan menganalisis protein hasil ekspresi gen spesifik dalam uterus pada periode kritis implantasi embrio. Lemons dan Naz (2011) juga menyatakan bahwa faktor yang esensial dan spesifik untuk kebuntingan merupakan target imunokontrasepsi yang potensial.

Implantasi embrio merupakan salah satu tahap reproduksi yang berlangsung dengan proses yang kompleks dan melibatkan sejumlah *molecular marker* yang diekspresikan oleh uterus atau blastokis (Minas *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2006; Lemons dan Naz, 2011). Proses implantasi juga diregulasi oleh hormon yang mempengaruhi ekspresi molekul pengatur serta ekspresi beberapa *cell adhesion molecule*, sitokin, *growth factor* serta *chemokine* (Sharkey dan Smith, 2003; van Mourik *et al.*, 2009; Lemons dan Naz, 2011).

Beberapa protein esensial dalam proses implantasi yang diekspresikan dalam uterus, yaitu *heparin binding epidermal growth factor (HB-EGF)*, *leukemia inhibitory factor (LIF)*, *COX2*, integrin spesifik dan inhibitor metalloprotein (Rice dan Chard, 1998; Carson *et al.*, 2000). Protein esensial pada blastokista yang berperan dalam proses implantasi diantaranya proteoglikan heparin sulfat, *adhesion promoting activities*, dan beberapa *epithelial growth factor (EGF)* (Norwitz *et al.*, 2001; Cross, 2002). Sitokin, terutama IL-1, juga merupakan protein yang esensial dalam proses implantasi embrio (Paria *et al.*, 2002). Sharkey dan Smith (2003) menyatakan bahwa selama proses implantasi embrio terjadi perubahan jenis serta jumlah molekul pengatur proses implantasi, yaitu LIF, *Gp130*, *Hmx3*, *Hoxa10*, *Hoxa11*, IL-11R, dan integrin $\alpha_v\beta_3$. Lemons dan Naz (2011) menyatakan bahwa sampai saat ini telah diidentifikasi 76 faktor (berupa sitokin, kemokin, *growth factor*) yang berperan dalam beberapa tahap perkembangan kebuntingan pada hewan atau kehamilan pada manusia.

Hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan mencit (*Mus musculus*) sebagai hewan coba menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi protein yang diambil pada hari kebuntingan ke-3 sampai ke-5. Dugaan penyebab hasil penelitian tersebut adalah kemungkinan protein yang diekspresikan dalam jumlah yang kecil (Sitasiwi dan Djaelani, 2011). Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi protein yang diekspresikan selama proses implantasi embrio.

MATERI DAN METODE

Hewan uji untuk penelitian ini adalah tikus Wistar betina dara, dengan bobot badan berkisar 280-300 g dan diadaptasikan selama 7 hari sesuai metode Lloyd *et al.* (2003) dan Hardy *et al.* (2004). Hewan uji dikawinkan dengan cara menggabungkan 4 ekor tikus

betina dengan satu ekor tikus jantan dalam satu kandang. Penggabungan hewan uji jantan dan betina dilakukan pada saat hewan betina sedang mengalami fase estrus. Fase penyusutan siklus estrus hewan ditentukan dengan *vaginal smears* (ulas vagina). Tikus betina yang telah kawin ditandai dengan terbentuknya *vaginal plug* (sumbat vagina). Hari yang ditandai dengan terbentuknya *vaginal plug* pada hewan coba diasumsikan sebagai hari pertama kebuntingan. Tikus yang telah kawin dikorbankan secara *dislocatio cervicalis* pada umur kebuntingan hari ke-3, 4, dan 5, lalu dibedah pada bagian abdomen bawah dan dilakukan isolasi uterus.

Uterus yang telah diisolasi, dihomogenisasi dengan larutan *phosphate buffer solution (PBS)* untuk elektroforesis sesuai dengan manual produk Bio-Rad. Sampel uterus dalam PBS selanjutnya disentrifugasi secara bertahap, yaitu 700 g selama 10 menit pada suhu kamar, dilanjutkan dengan 10.000 g selama 4 menit pada suhu 4° C. Kandungan protein sampel diukur menggunakan *spectrophotometer UV* dengan λ 280 dan λ 260. *Separating gel* elektroforesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi 12%, sedangkan konsentrasi *stacking gel* adalah 3%. *Loading* sampel dilakukan dengan jumlah 20 μ l sedangkan protein standar dilakukan dengan jumlah 6 μ l. *Running* dilakukan selama 75 menit dengan kuat arus 60 mA dan tegangan 125 volt. *Staining* (pewarnaan) gel dilakukan selama 1 malam.

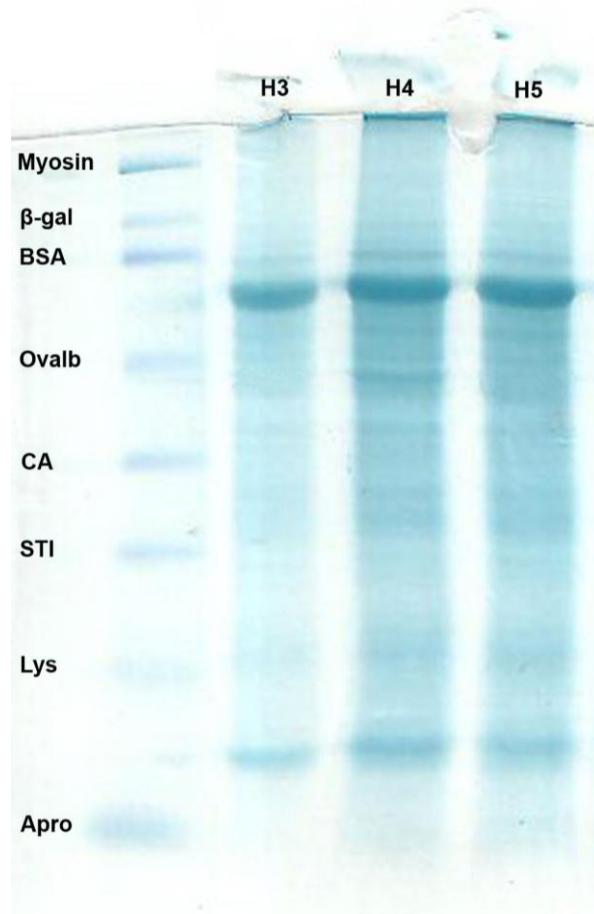
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil elektroforesis protein uterus dari hari ke-3 sampai dengan ke-5 kebuntingan disajikan pada Gambar 1. Pemilihan hari ke-3 sampai ke-5 kebuntingan berdasarkan waktu implantasi embrio pada mencit yang terjadi pada hari ke-4 kebuntingan (Nivsarkar *et al.*, 2001; Grummer *et al.*, 2004). Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa protein marker terseparasi dengan sempurna (kolom paling kiri pada Gambar 1). Hal tersebut menggambarkan bahwa prosedur elektroforesis sudah sesuai karena *protein marker* pada kolom pertama sudah terseparasi dengan sempurna, yaitu secara berurutan dari berat molekul yang besar adalah *myosin*, β -*galactosidase*, *bovine serum albumin*, *ovalbumin*, *carbonic anhydrase*, *lysin*, dan *aprotinin*. Pita protein sampel uterus berasal dari hewan yang dikawinkan pada kolom H3, H4, dan H5 dari hewan dengan umur kebuntingan 3-5 hari.

Pita protein sampel uterus yang berasal pada hari ke-3 dan ke-5 kebuntingan memiliki kemiripan. Perbedaan pita protein tampak pada hari kebuntingan ke-4. Pita yang memiliki berat molekul setara dengan ovalbumin pada *protein marker* hanya ditemukan pada sampel protein yang berasal dari hari kebuntingan ke-4.

Ekspresi beberapa molekul penanda implantasi embrio menurut Castro-Rendon *et al.* (2006) terjadi melalui sejumlah interaksi yang spesifik, berturut-turut LIF, HB-EGF, IL-1, dan COX-2. *Leukemia Inhibitory Factor* merupakan molekul penanda implantasi embrio

yang pertama diekspresikan, yaitu terjadi pada pertengahan hari ke-4 kebuntingan (Sharkey dan Smith, 2003; Castro-Rendon *et al.*, 2006). Ekspresi LIF terjadi pada kelenjar endometrium, berlangsung pada waktu yang singkat (Dey *et al.*, 2004) di bawah regulasi oleh hormon estrogen dan progesteron (Sharkey dan Smith, 2003; Dey *et al.*, 2004; Schofield dan Kimber, 2005). Ekspresi LIF juga diaktivasi oleh gen *Hmx3* (Sharkey dan Smith, 2003; Hu *et al.*, 2007).



Gambar 1. Hasil elektroforesis protein uterus tikus Wistar dengan SDS-PAGE pada hari kebuntingan ke-3 (H3), 4 (H4), dan 5 (H5). (Protein marker terdiri dari myosin; β -gal= beta galactosidase; BSA= bovine serum albumin; Ovalb= ovalbumin; CA= carbonic anhydrase; STI= soybean trypsin inhibitor; Lys= lysin; Apro= aprontinin)

Leukemia inhibitory factor merupakan sitokin (Stewart, 1994) yang bekerja secara parakrin, menyebabkan proliferasi dan diferensiasi epitel endometrium sehingga endometrium siap untuk implantasi (Chen *et al.*, 2000). *Leukemia inhibitory factor* bekerja dengan cara melekat pada reseptor LIF (LIFR) pada sel-sel epitel luminal (Cheng *et al.*, 2001 yang disitasi Sharkey dan Smith, 2003; Hondo dan Stewart, 2004). Sharkey dan Smith (2003) menambahkan bahwa LIF juga beraksi dengan cara mengaktivasi *gp130* pada epitel luminal sehingga menyebabkan aktivasi LIFR. Ekspresi LIF pada tikus terjadi pada hari ke-4 kebuntingan pada epitel glandula uterus (Chen *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2004) serta pada

embrio pre-implantasi dan sitotrofoblas (Staun-Ram dan Shalev, 2005). Ekspresi LIF sangat diperlukan selama proses implantasi, apabila ekspresi tidak terjadi maka ekspresi berbagai molekul, baik epitel luminal maupun stroma tidak terjadi (Rodriguez *et al.*, 2004; Sherwin *et al.*, 2004; Staun-Ram dan Shalev, 2005).

Hasil penelitian Grummer *et al.* (2004) serta Hayashi *et al.* (2009) menunjukkan bahwa waktu ekspresi *molecular marker* pada tikus adalah pertengahan hari ke-4. Selain hal tersebut, menurut Norwitz *et al.* (2001) serta van Mourik *et al.* (2009), bahwa ekspresi tersebut berlangsung dalam waktu yang singkat. Minas *et al.* (2005) menyatakan bahwa pada rodensia proses ini hanya berlangsung dalam waktu 24 jam. Ekspresi protein dalam penelitian ini terjadi dalam waktu yang singkat, yaitu hanya pada hari ke-4, tidak terekspresi pada hari ke-3 dan ke-5 sehingga dapat diasumsikan molekul yang terekspresi pada penelitian ini merupakan salah satu molekul penentu implantasi embrio.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa protein yang terekspresi pada sampel uterus tikus umur kebuntingan hari ke-4 setara dengan protein *marker ovalbumin* yang memiliki berat molekul berkisar 45 kDa. Sharkey dan Smith (2003) menyatakan bahwa pada saat implantasi embrio terjadi ekspresi sejumlah molekul, diantaranya LIF, Gp130, Hmx3, Hoxa10, COX-2, IL-11R, HB-EGF, integrin $\alpha_v\beta_3$. Berat molekul tersebut bervariasi dari 20-70 kDa, namun yang memiliki berat molekul 45 kDa adalah LIF sehingga diduga bahwa pita protein yang terekspresi pada hari ke-4 adalah LIF. Asumsi ekspresi LIF ini akan dilakukan dalam penelitian berikutnya menggunakan teknik *immunoblotting*.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa protein yang terekspresi pada kebuntingan hari ke-4 diduga adalah LIF.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonimus. 2010. **Melawan Hama Tikus dengan TBS**. Info Balitbang Pertanian, Jakarta.
- Bowen, R.A. 2006. Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. **Anim. Reprod. Sci.** 105:139-143.
- Carson, D.D., I. Bagchi, S.K. Dey, A.C. Enders, A.T. Fazleabas, B.A. Lessey, and K. Yoshinaga. 2000. Review: Embryo implantation. **Devl. Biol.** 223:217-237.
- Castro-Rendón, W.A., J.F. Castro-Álvarez, C. Guzmán-Martínez, and J.C. Bueno-Sánchez. 2006. Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 39:1373-1385.
- Chen, J.R., J.G. Cheng, T. Shatzer, L. Sewell, L. Hernandez, and C.L. Stewart. 2000. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. **Endocrinol.** 141:4365-4372.
- 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, and I.M. Roitt. 2002. Antifertility vaccines. **Trends in Immunol.** 23:213-219.

- Dey, S.K., H. Lim, S.K. Das, J. Reese, B.C. Paria, T. Daikoku, and H. Wang. 2004. Molecular cues of implantation. **Endocrine Reviews**. 25(3):341-373.
- Ferro, V.A. 2002. Current advances in antifertility vaccines for fertility control and noncontraceptive application. **Expert Rev. Vacc.** 1:443-452.
- Grummer, R., S.W. Hewitt, O. Traub, K.S. Korach, and E. Wittenhager. 2004. Different regulatory pathways on endometrial connexin expression: preimplantation hormonal-mediated pathway versus embryo implantation-mediated pathway. **Biol. Reprod.** 71:273-281.
- Hardy, C.M., G. Clysdale, and K.J. Mobbs. 2004. Development of the mouse-specific contraceptive vaccines: Infertility in mice immunized with peptide and polypeptide antigens. **Reprod.** 128:395-407.
- Hayashi, K., D.W. Erikson, S.A. Tilford, B.M. Bany, J.A. Maclean, E.B. Rucker, G.A. Johnson, and T.E. Spencer. 2009. *Wnt* genes in the mouse uterus: Potential regulation of implantation. **Biol. Reprod.** 88:989-1000.
- Hondo, K. and C.L. Stewart. 2004. The implantation process of mouse embryo. **Genome Biol.** 6:202-209.
- Hu, Wenwei, F. Zhaohui, K.T. Angelika, and A.J. Levine. 2007. p53 Regulates maternal reproduction through LIF. **Nature** 450:721-724.
- Kirkpatrick, J.F., R.O. Lyda, and K.M. Frank. 2011. Contraceptive vaccines for wildlife: A review. **Am. J. Reprod. Immunol.** 60(1):40-50.
- Lemons, A.R. and R.K. Naz. 2011. Contraceptive vaccines targeting factors involved in establishment of pregnancy. **Am. J. Reprod. Immunol.** 66(1):13-25.
- Lloyd, M.L., G.R. Shellam, J.M. Papadimitriou, and M.A. Lawson. 2003. Immunocontraception is induced in BALB/c mice inoculated with murine cytomegalovirus expressing mouse zona pellucida 3. **Biol. Reprod.** 68:2024-2032.
- Minas, V., D. Loutradis, and A. Makrigiannakis. 2005. Factors controlling blastocyst implantation. **Reprod. BioMed. Online** 10(2):205-216.
- Moore, H.D.M., N.M. Jenkins, and C. Wong. 1997. Immunocontraception in rodents: A review of the development of a sperm-based immunocontraceptive vaccine for the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*). **Reprod. Fertil. Dev.** 9(1):125-130.
- Naz, R.K., S.K. Gupta, J.C. Gupta, H.K. Vyas, and G.P. Talwar. 2005. Recent advances in contraceptive vaccine development: A mini review. **Hum. Reprod.** 20(12):3271-3283.
- Nie, Gui-Ying, A.R. Butt, L.A. Salamonsen, and J.K. Findlay. 1997. Hormonal and non hormonal agents at implantation as targets for contraception. **Reprod. Fertil. Dev.** 9:65-76.
- Nivsarkar, M., A. Sethi, C. Bapu, M. Patel, and H. Padh. 2001. Involvement of endometrial; membrane sulphydryl groups in blastocyst implantation: Sulphydryl groups as a potential target for contraceptive research. **Contraception**. 64:255-259.
- Norwitz, E.R., D.J. Schust, and 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, and S.K. Dey. 2002. Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. **Science**. 296:2185-2188.
- Rice, A. and T. Chard. 1998. Cytokines in implantation. **Cytokine Growth Factor Rev.** 9:287-296.
- Rodriguez, C.I., J.G. Cheng, L. Liu, and C.L. Stewart. 2004. Cochlin, a secreted von Willebrand factor type a domain-containing factor, is regulated by leukemia inhibitory factor in the uterus at the time of embryo implantation. **Endocrinol.** 145:1410-1418.
- Schofield, G. and S.J. Kimber. 2005. Leukocyte populations in uteri of Leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. **Biol. Reprod.** 72:872-878.
- Sharkey, A.M. and S.K. Smith. 2003. The endometrium as a cause of implantation failure. **Best Pract. Res. Clin. Obst. Gyn.** 17(2):289-307.
- Sherwin, J., T. Freeman, R. Stephens, S. Kimber, A. Smith, I. Chambers, S. Smith, and A. Sharkey. 2004. Identification of genes regulated by Leukemia Inhibitory Factor in the mouse uterus at the time of implantation. **Mol. Endocrinol.** 18(9):2185-2195.
- Sitasiwi, A.J. dan M.A. Djaelani. 2011. Studi awal upaya eksplorasi agensi imunokontrasepsi untuk regulasi fertilitas hewan liar: Profil protein selama proses implantasi embrio mencit (*Mus musculus* L.) BALB/c. **Bioma**. 13(1):39-45.
- Smith, G., A. Walmsley, and I. Polkinghorne. 1997. Plant-derived immunocontraceptive vaccine. **Reprod. Fertil. Steril.** 9(1):85-90.
- Staun-Ram, E. and E. Shalev. 2005. Human trophoblast function during the implantation process. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 3:56-68.
- Stewart, C.L. 1994. Leukaemia inhibiting factor and the regulation of the pre-implantation development of mammalian embryo. **Mol. Reprod. Dev.** 39:233-238.
- Van Mourik, M.S.M., N.S. Macklon, and C.J. Heijnen. 2009. Embryonic implantation: Cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. **J. Leukoc. Biol.** 85(1):4-19.
- Yang, Y.J., C. Yu-Jing, B. Shu-Min, S. Peng, L. Wei-Min, and D. En-Kui. 2006. Leptin-directed embryo implantation: Leptin regulates adhesion and outgrowth of mouse blastocysts and receptivity of endometrial epithelial cells. **Anim. Reprod. Sci.** 19:155-167.