

## Perkembangan Folikel dan Viabilitas Oosit Domba Pascatransplantasi Ovarium Domba Intrauterin pada Kelinci Bunting Semu

**(THE DEVELOPMENT OF FOLLICLES AND OOCYTES VIABILITY FROM EWE OVARIUM POST-INTRAUTERINE TRANSPLANTATION TO PSEUDOPREGNANT RABBIT)**

**Ramadhan Sumarmin<sup>1</sup>, Adi Winarto<sup>2</sup>,  
Tutty Laswardi Yusuf<sup>3</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Padang, Jl. Prof. Dr. Hamka, Kampus Air Tawar, Padang, Sumatra Barat 25131, E-mail: [sumarmin68@yahoo.co.id](mailto:sumarmin68@yahoo.co.id)  
<sup>2</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi; <sup>3</sup>Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus Dramaga, Bogor 16680.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the development of ewe follicles and oocytes viability following an intrauterine transplantation of the ovaries into pseudopregnant rabbit. The experiment was conducted in day 1 of pseudopregnant rabbit. Following transplantation for 5, 7, and 9 days, the ovaries were recollected. The development of follicles determined by counting the number of follicles in paraffin embedded ovaries after staining with haematoxylin-eosin (HE). The viability of oocytes was determined by slicing the ovaries. Oocytes were incubated in CO<sub>2</sub> incubator with 5% CO<sub>2</sub> 38°C for 24 hours. After maturation, the oocytes were stained with 2% aceto-orcein to determine the nuclear oocytes status. The result showed that follicles were detected in all stages of their development (primordial, primary, preantral, and antral follicle stages), but their number decreased significantly (P<0.05) 5, 7 or 9 days after transplantation, except for those at primordial stage which at day 5 post-transplantation (634.7±56.88) were not significantly different to the control (683.7±61.55). After maturation, the oocytes that were able to reach the M-II phase at day 5 and day 7 post-transplantation were 35.05% and 35.24% respectively. They were significantly (P<0.05) lower than the control (56.65%). In conclusion, the development of follicles and oocytes viability in the ewe ovaries in pseudopregnant rabbits was still preserved during intrauterine transplantation.

Key word: ovarium, follicles, oocytes, viability, post-intrauterine transplantation

### PENDAHULUAN

Setiap ovarium mengandung oosit dalam jumlah yang sangat banyak, tetapi hanya sedikit sekali dari jumlah oosit tersebut yang dimatangkan dan diovasulasikan selama masa subur atau pada masa reproduksi. Meskipun secara *in vitro* atau melalui superovulasi dapat dihasilkan oosit matang (*matured oocytes*) dalam jumlah yang banyak, namun sedikit sekali oosit yang dapat dibuahi oleh spermatozoa (Cushman *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002). Pada transplantasi interspesies, proses perkembangan folikel primordial, pematangan terhadap inti dan sitoplasma oosit diharapkan terjadi secara sempurna pada setiap

perkembangan folikel. Teknik transplantasi interspesies ini merupakan salah satu cara alternatif pemecahan permasalahan untuk preservasi dan transportasi ovarium sebagai sumber gamet (Parkening *et al.*, 1985; Disen *et al.*, 1994).

Ovarium yang sebelumnya telah dibekukan jika ditransplantasikan memperlihatkan pula bahwa jaringan ovarium toleran terhadap proses pembekuan dan *thawing*. Potongan bagian korteks ovarium domba yang telah dibekukan selama tiga minggu kemudian dilakukan *thawing* dan ditransplantasikan secara autologus pada daerah pelvis, ternyata mampu kembali berperan dalam produksi *follicle stimulating hormone* (FSH) dan mencapai

keadaan normal setelah empat bulan kemudian. Pada domba tersebut secara normal juga terjadi perkawinan dan kebuntingan (Gosden *et al.*, 1994).

Transplantasi interspesies lainnya dilakukan secara intrauterin oleh Kagabu dan Umezu (2001). Ovarium mencit yang sudah dibekukan dan kemudian dilakukan *thawing* berhasil ditransplantasikan ke dalam rongga uterus tikus. Pada penelitian tersebut ditemukan banyak folikel yang berkembang dengan baik. Sumarmin *et al.* (2007) menemukan keutuhan ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci *pseudopregnant* lebih dari 90% hingga hari ke-9, terutama posisi transplan pada kornua uteri yang dekat dengan ovarium kelinci.

Evaluasi terhadap perkembangan folikel dan viabilitas oosit domba pascatransplantasi secara intrauterin pada kelinci *pseudopregnant* perlu dilakukan sebagai informasi dasar untuk kepentingan transportasi, konservasi, *embryo rescue*, dan *gamete banking (bank gamet)*. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji perubahan histologi, perkembangan folikel, dan viabilitas oosit domba pascatransplantasi ovarium domba secara intrauterin pada kelinci *pseudopregnant*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap penerapan dan pengembangan teknologi transplantasi ovarium interspesies terutama yang dilakukan dalam rangka preservasi, transportasi, dan optimalisasi pemanfaatan ovarium.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan Ovarium Domba Donor

Ovarium domba hasil koleksi dari rumah potong hewan (RPH) sesampai di laboratorium dibersihkan dari jaringan lain yang menyertainya pada saat *sampling* dengan menggunakan gunting dan pinset. Ovarium yang telah bersih dibelah menjadi empat bagian dan untuk sementara potongan ovarium tersebut ditempatkan dalam cawan petri yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% dan antibiotik penisilin G 100 IU/ml.

### Penyiapan Kelinci Resipien dan Teknik Transplantasi

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci betina jenis *New Zealand White* yang telah dewasa kelamin

dengan bobot badan 2,5-3,0 kg. Untuk mendapatkan kelinci bunting semu hari pertama, dilakukan kopulasi tiruan dengan memasukkan *cotton bud* sepanjang 1 cm ke dalam vagina kelinci pada pukul lima pagi. Empat jam setelah kopulasi tiruan, kelinci dijadikan sebagai resipien.

Kelinci resipien dianestesi dengan menginjeksikan 20 mg ketamin/kg bb (Ilium, NSW, 100 mg ketamin/ml) dan 10 menit kemudian diinjeksi dengan 2 mg xylazine/kg bb (Ilium, NSW, 20 mg xylazine/ml) secara intramuskular. Setelah kelinci teranestesi diletakkan di atas meja bedah dan dicukur rambut di sekitar daerah *linea alba* serta dibersihkan dengan alkohol 70%. Penyayatan dilakukan pada *linea alba* sepanjang 3-4 cm (kulit, otot perut, dan *peritoneum*) dan dilanjutkan dengan membuat sayatan pada *dorsal* uterus sepanjang 1 cm. Melalui celah tersebut potongan jaringan ovarium domba didorong ke arah kornua uteri. Transplantasi potongan ovarium dilakukan pada kedua kornua uteri kelinci. Setelah ovarium domba ditransplantasikan, sayatan pada uterus, *peritoneum*, otot perut, dan kulit dijahit untuk menutup luka (Techakumphu *et al.*, 1987; Forcada dan Lopez, 2000).

### Pembuatan Preparat Histologi Ovarium Domba

Ovarium domba segar (kontrol) dan ovarium domba pascatransplantasi yang dikoleksi kembali pada hari ke-5, 7, atau 9 difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam. Untuk pengerjaan pembuatan preparat, selanjutnya dilakukan sesuai dengan metode parafin dan pewarnaan hematoksilin-eosin (Kiernan, 1990).

### In Vitro Maturation (IVM) Oosit Domba

Maturasi oosit domba hasil koleksi dengan teknik *slicing* dari ovarium domba segar (kontrol) dan ovarium domba pascatransplantasi dilakukan dalam *tissue culture medium* (TCM) 199 yang dilengkapi dengan *fetal bovine serum* (FBS) 10%, FSH 10 IU/ml dan penisilin-streptomisin 100 IU/ml (Boediono *et al.*, 2000). Pematangan oosit pada medium maturasi berbentuk *drop* masing-masing 50  $\mu$ l untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* di dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, 38°C selama 24 jam. Penentuan status inti setelah maturasi dilakukan dengan pewarnaan *aceto-orcein* 2%.

### Pengamatan terhadap Variabel Percobaan

Pengamatan histologi ovarium, tingkat perkembangan folikel mengacu pada Junqueira dan Corneiro, (1991) dan penghitungan jumlah folikel primordial, primer, preantral, dan antral dilakukan dengan bantuan mikroskop binokuler dan *hand tally counter*. Untuk menentukan kematangan oosit digunakan kriteria status inti, yaitu *germinal vesicle break down* (GVBD), *metaphase-I* (M-I), dan *metaphase-II* (M-II).

### Analisis Data

Perubahan histologi jaringan ovarium dideskripsikan dan dibandingkan antar perlakuan dan kontrol. Data rerata jumlah folikel berbagai tingkat perkembangan dan rerata oosit berbagai status inti yang didapatkan selanjutnya diuji dengan sidik ragam (Steel dan Torrie, 1993). Data diolah menggunakan program *SAS system 12*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Histologi Ovarium dan Perkembangan Folikel Domba Pascatransplantasi

Berdasarkan pengamatan histologi pada semua perlakuan transplantasi masih ditemukan folikel pada berbagai tingkat perkembangan, yaitu folikel primordial, primer, preantral, dan antral (Gambar 1). Ditemukannya folikel pada berbagai tingkat perkembangan kemungkinan disebabkan oleh masih utuhnya struktur epitel yang melindungi bagian korteks ovarium sehingga struktur korteks yang masih baik ini dapat menopang tetap berlangsungnya metabolisme sel-sel secara normal. Sumber energi diperkirakan berasal dari sekreta uterus kelinci yang diserap secara difusi oleh epitel atau pun bagian lainnya karena sejak awal kebuntingan kelenjar pada endometrium uterus kelinci menghasilkan dan mengeluarkan sekreta ke dalam lumen uterus sebagai cadangan nutrisi untuk embrio menjelang terjadinya implantasi (Colby, 1986; Holt, 1989). Sumber energi ini sekaligus dapat mencegah atau memperlambat proses autolisis pada ovarium domba yang ditransplantasikan.

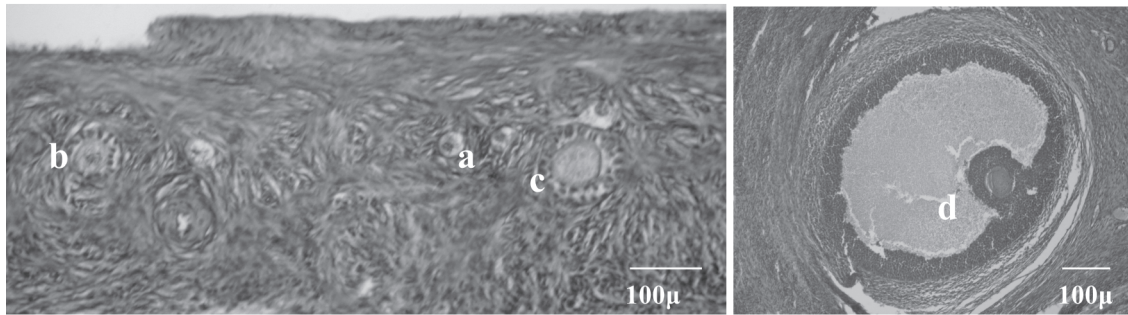
Pada Gambar 2 dapat diketahui kerusakan jaringan ovarium domba pascatransplantasi yang ditemukan berupa kerusakan jaringan epitel, folikel berdegenerasi, terbentuknya rongga antar sel dan terbentuknya agregat protein. Folikel yang berdegenerasi selanjutnya membentuk agregat protein, sedangkan rongga

antar sel terbentuk karena *junction* antar sel yang terputus akibat kematian sel. Kerusakan jaringan ini terutama ditemukan mulai pada kelompok pascatransplantasi, tujuh dan sembilan hari yang tampaknya disebabkan proses autolisis. Pada kelompok perlakuan lima hari pascatransplantasi ditemukan gambaran kelainan histologi jaringan ovarium domba yang tidak berbeda nyata dengan kontrol.

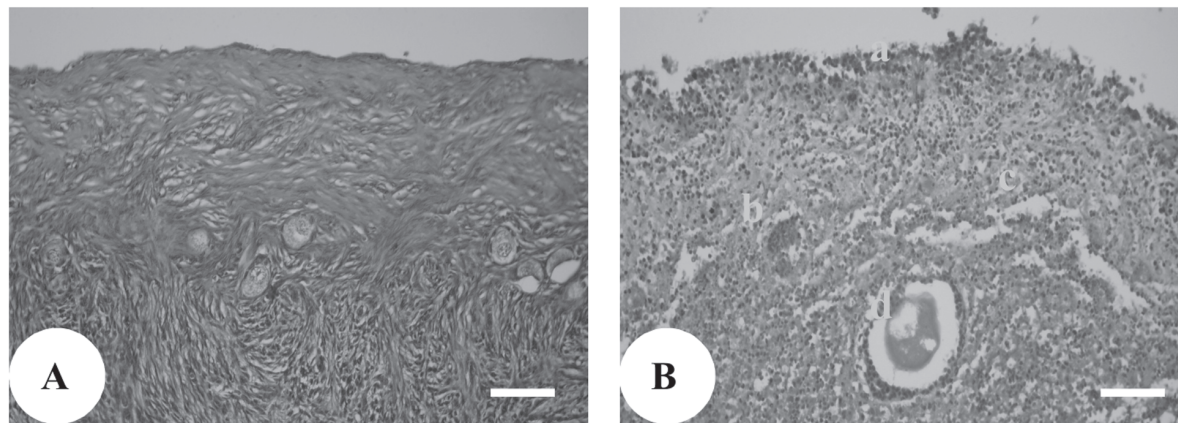
Dari Tabel 1 diketahui rerata folikel primordial yang ditemukan pada ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci selama lima hari tidak berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol masing-masing  $683,7 \pm 61,55$  dan  $634,7 \pm 56,88$ . Rerata folikel primordial yang ditemukan pada ovarium domba pascatransplantasi tujuh hari ( $532,4 \pm 46,66$ ) menurun nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan ovarium domba pascatransplantasi lima hari dan kontrol. Rerata folikel primordial pada ovarium domba pascatransplantasi sembilan hari  $198,0 \pm 54,65$  menurun nyata ( $P < 0,05$ ) dibandingkan dengan ketiga perlakuan lainnya. Penyebab menurunnya rerata folikel primordial kemungkinan karena proses autolisis pada jaringan korteks ovarium domba yang ditransplantasikan yang ditandai dengan ditemukannya agregat protein sebagai hasil pelepasan beberapa sel atau agregat protein yang terwarnai di antara sel-sel bagian korteks pada tujuh dan sembilan hari pascatransplantasi tetapi tidak ditemukan pada kontrol. Diduga sebagian agregat protein yang ditemukan pada bagian korteks tersebut juga berasal dari degenerasi folikel primordial.

Rerata folikel primer, preantral, dan antral menurun sejalan dengan lamanya waktu transplantasi ovarium domba. Penurunan rerata folikel primer, preantral, dan antral ini kemungkinan disebabkan oleh rusaknya jaringan epitel dan berdegenerasinya sel-sel pada bagian korteks dan medula dari jaringan ovarium domba yang ditransplantasikan. Kerusakan tersebut juga menyebabkan folikel primer, preantral, dan antral yang ada pada saat ditransplantasikan dan berada dekat dengan lokasi pemotongan akan lebih mudah menjadi kolaps karena sebagian besar sel-selnya berdegenerasi. Pada ovarium domba pascatransplantasi sembilan hari ditemukan kerusakan yang sangat banyak maka pada percobaan selanjutnya tidak dilakukan.

Hal lain yang diduga menjadi penyebab penurunan jumlah folikel pada berbagai tingkat



Gambar 1. Berbagai tingkat perkembangan folikel : a. Folikel Primordial, b. Folikel Primer, c. Folikel Preantral, dan d. Folikel Antral.



Gambar 2. Korteks ovarium. A. Histologis ovarium utuh (kontrol & P5). B. Histologis ovarium yang rusak (P7 & P9). a. epitel yang rusak. b. Agregat protein c Rongga antar sel. d. Folikel berdegenerasi, Bar = 100µ

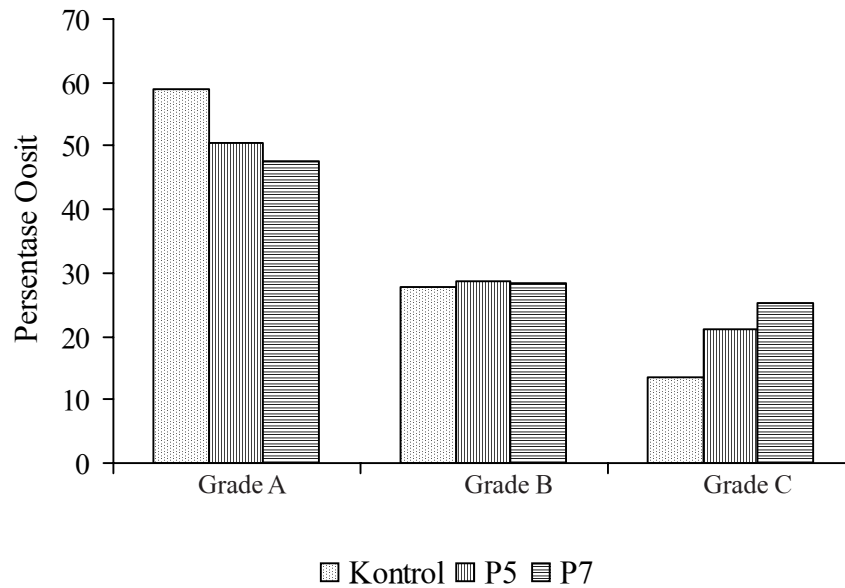
Tabel 1. Rerata jumlah folikel dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci bunting semu

Pascatrans- plantasi (hari)	Rerata Jumlah Folikel			
	Primordial	Primer	Preantral	Antral
0 (kontrol)	683,7±61,55 <sup>a</sup>	452,2 ±41,46 <sup>a</sup>	38,8±4,73 <sup>a</sup>	5,7 ±1,83 <sup>a</sup>
5	634,7±56,88 <sup>a</sup>	345,1±43,57 <sup>b</sup>	32,6±3,67 <sup>b</sup>	5,4±0,84 <sup>b</sup>
7	532,4±46,66 <sup>b</sup>	240,1±35,30 <sup>c</sup>	19,0±2,87 <sup>c</sup>	3,2±1,03 <sup>c</sup>
9	198,0±54,65 <sup>c</sup>	70,6±22,94 <sup>d</sup>	7,0±3,02 <sup>d</sup>	1,2±1,34 <sup>d</sup>

Keterangan : Notasi huruf superskrip berbeda pada kolom yang sama, berbeda nyata pada taraf signifikansi p<0,05

perkembangan selain disebabkan rusaknya jaringan epitel atau degenerasi folikel bersamaan dengan proses terpisahnya bagian korteks dan medula ovarium domba adalah proses *apoptosis* yang terjadi pada folikel. Dalam keadaan normal proses *apoptosis* terjadi pada saat

*recruitment, selection, dan dominant* pada proses pertumbuhan folikel. Salah satu induktor terjadinya *apoptosis* adalah kegagalan proses respirasi mitokondria di dalam sel akibat kekurangan oksigen atau hipoksia (Tilly, 1996; Tilly, 1998).



Gambar 3. Persentase oosit hasil koleksi dari ovarium domba pada berbagai kualitas atau grade sebelum proses maturasi *in vitro*

**Viabilitas Oosit Domba Pascatransplantasi**

Maturasi oosit bertujuan untuk mematangkan oosit sehingga menghasilkan oosit sekunder *haploid* yang memiliki komponen sel yang diperlukan pada saat fertilisasi dan perkembangan embrio nantinya. Tahap awal dari proses maturasi *in vitro* ini adalah mengoleksi oosit dari ovarium. Oosit hasil koleksi dapat dikategorikan: a). oosit kualitas A yaitu oosit yang memiliki beberapa lapisan sel-sel kumulus yang tebal dan kompak di sekelilingnya, sitoplasma oosit konsisten seragam dan cerah, b). oosit kualitas B adalah oosit yang memiliki beberapa lapisan sel-sel kumulus yang agak tipis, kompak dan sitoplasma oosit konsisten seragam dan cerah, dan c). oosit kualitas C adalah oosit yang memiliki lapisan sel-sel kumulus yang tidak konsisten tebalnya, lapisan sel-sel kumulus pada beberapa bagian terlepas (atau bahkan tanpa sel-sel kumulus) dan sitoplasma berwarna agak gelap (Fulka *et al.*, 1998).

Pada Gambar 3 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan persentase jumlah oosit kualitas A secara nyata ( $P < 0,05$ ) yang dikoleksi dari ovarium domba pascatransplantasi lima hari (50,42) dan tujuh hari (47,57) dibandingkan dengan kontrol (58,82). Persentase jumlah oosit kualitas B tidak berbeda nyata antar perlakuan tetapi pada persentase oosit kualitas C ditemukan peningkatan nyata ( $P < 0,05$ ) pada

lima hari (21,01) dan tujuh hari (25,24) pascatransplantasi dibandingkan kelompok kontrol (13,45).

Selanjutnya hasil pengamatan yang dilakukan terhadap hasil proses maturasi oosit domba setelah 24 jam inkubasi dapat pula dibedakan antara kultur yang berhasil atau tidak berhasil dengan mengamati ada tidaknya ekspansi sel-sel kumulus. Pada penelitian ini ditemukan ekspansi sel-sel kumulus baik pada oosit yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi lima hari atau tujuh hari mau pun pada kelompok kontrol.

Tahapan pematangan inti oosit domba yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi lima hari dan tujuh hari serta kelompok kontrol secara *in vitro* yang diamati pada penelitian ini adalah GVBD, M-I, dan M-II. Sedangkan persentase jumlah hasil pematangan inti oosit domba yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi dalam medium TCM-199 terlihat pada Tabel 2.

Oosit yang mencapai tahap M-II pada kelompok kontrol sebanyak 57,68%, lebih tinggi ( $P < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan oosit M-II pascatransplantasi lima hari 37,82% dan pascatransplantasi tujuh hari 32,02%. Perbedaan persentase jumlah oosit yang mampu mencapai tahap M-II ini diduga karena sebagian besar oosit yang dimaturasi dari kelompok perlakuan pascatransplantasi lima hari dan pascatransplantasi tujuh hari mengalami

Tabel 2. Tingkat pematangan inti oosit domba yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci *pseudopregnant*

Pascatransplantasi (hari)	Jumlah Oosit	Jumlah oosit dengan kriteria status (%)			
		GVBD	M-I	M-II	TI
5	119	32 (26,89)a	38 (31,92)a	45 (37,82)b	4 (3,36)
7	103	29 (28,16)a	35 (33,98)a	33 (32,03)c	6 (5,83)
0	119	21 (17,65)b	27 (22,69)b	68 (57,68)a	3 (2,52)

Keterangan: GVBD: Germinal Vesicle Break Down, M-I: Metafase I, M-II: Metafase II, TI: tidak teridentifikasi. Notasi huruf yang berbeda pada satu kolom, menunjukkan perbedaan nyata ( $p < 0,05$ )

penurunan viabilitas karena selama transplantasi juga terjadi proses autolisis. Meskipun pada kelinci pseudopregnansi sekreta *uterine milk* tetap dipertahankan hingga masa bunting semu berakhir pada 16-19 hari (Colby, 1986), namun dengan kapasitas sekresi yang terus menurun pula. Akibat autolisis inilah maka sebagian besar oosit yang dimaturasi bertahan pada tahap GVBD atau mencapai M-I.

Persentase jumlah oosit yang berada pada tahap M-I pada kelompok pascatransplantasi lima hari 31,92% dan pascatransplantasi tujuh hari 33,98%, jauh lebih banyak dibandingkan kelompok kontrol 22,69%. Keadaan ini masih memberikan kemungkinan untuk meningkatkan persentase jumlah oosit yang mencapai M-II pada kelompok pascatransplantasi lima hari atau pascatransplantasi tujuh hari dengan cara melengkapi medium dengan suplemen hormon estrogen, *luteinizing hormone* (LH) atau progesteron. Yulnawati (2006) menemukan persentase jumlah oosit domba yang matang mencapai tahap M-II sebesar 73,27% dengan menggunakan medium TCM-199 yang disuplementasi FSH, progesteron, estrogen, dan LH. Pada penelitian ini medium TCM-199 hanya disuplementasi dengan FBS dan hormon FSH saja. Penambahan hormon FSH dan LH ke dalam medium maturasi dapat meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus dan mengatasi hambatan meiosis pada oosit babi (Niwa, 1993; Accardo *et al.*, 2004).

Persentase oosit domba pada perlakuan pascatransplantasi lima hari dan tujuh hari yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol kemungkinan juga disebabkan tidak seragamnya kualitas oosit hasil koleksi untuk

maturasi *in vitro*. Persentase jumlah oosit *grade C* pada kelompok pascatransplantasi lima hari dan pascatransplantasi tujuh hari lebih dari 30%. Oosit yang memiliki lebih dari lima lapis sel-sel kumulus akan meningkatkan jumlah oosit yang berkembang dibandingkan dengan oosit yang memiliki lapisan sel-sel kumulus tipis atau tidak memilikinya sama sekali. Keberadaan sel kumulus dapat mendukung pematangan oosit melalui zat metabolit yang dihasilkan dan disekresikan melalui mekanisme *gap junction* ke sel oosit (Bilodeau-Goeseels dan Panich, 2002; Setiadi, 2002).

## SIMPULAN

Transplantasi interspesies ovarium domba secara intrauterin pada kelinci bunting semu masih dapat mempertahankan folikel primordial, folikel primer, folikel preantral, dan folikel antral. Perubahan histologi ovarium domba mulai ditemukan pada hari ke-7 pascatransplantasi berupa kerusakan jaringan epitel, folikel berdegenerasi, terbentuknya rongga antar sel, dan terbentuknya agregat protein. Oosit yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci bunting semu sampai lima atau tujuh hari pascatransplantasi memiliki viabilitas yang baik. Teknik transplantasi intrauterin ovarium domba pada kelinci bunting semu dapat mempertahankan perkembangan folikel dan viabilitas oosit domba selama transplantasi.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dirjen DIKTI yang telah membiayai penelitian

ini melalui dana penelitian Tim Hibah Pascasarjana 2005-2007 dan Kepala Laboratorium Embriologi dan Histologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor atas izin penelitian yang telah diberikan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Mara L, Chessa B, Cappai P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on *in vitro* maturation sheep oocytes, embryos development and viability. *Anim Reprod Sci* 81: 77-86
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocytes quality development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 71: 143-155
- Boediono A, Rusiyantono Y, Mohammad K, Djuita I, Herliatin. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner* 7: 11-17
- Colby ED. 1986. The Rabbit In Morrow DA (Ed), *Current Theraphy in Theriogenology* 2. Philadelphia: WB Saunders Co. Pp. 1003-1005
- Cushman RA, Wahl CM, Fortune JE. 2002. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes: a model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reprod* 17: 48-54
- Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa MA, Ojeda SR. 1994. Immature rat ovaries becomes revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotrophine-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 134: 1146-1153
- Forcada F, Lopez M. 2000. Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbit. *Anim Reprod Sci* 64: 121-126
- Fulka JJ, First NL, Moor RM. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Mol Human Reprod* 4: 41-49
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, Webb R. 1994. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovaries autografts stored at -196 degrees C. *Human Reprod* 9: 597-603
- Holt JA. 1989. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus leteum. *Biol Reprod* 40: 201-208
- Junqueira LC, Corneiro J. 1991. *Histologi Dasar*. Edisi 2. Penerjemah Adji Dharma. Jakarta: EGC.
- Kagabu S, Umezu M. 2001. Effect blood transfusion on the survival rate of cryopreserved mouse ovaries transplanted into rat uterine cavity. *Mamm Ova Res*. 18: 58-61
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Pergamon Press.
- Liu J, Van der EJ, Van den BR, Dhont M. 2002. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reprod* 17: 605-611
- Niwa K. 1993. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization technique in pigs. *Reprod Fer* 48: 49-59
- Parkening TA, Collins TJ, Elder FFB. 1985. Orthotopic ovarian transplantations in young and aged C57BL/6J mice. *Biol Reprod* 32: 989-997
- Setiadi MA. 2002. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes *in vitro*. *Reprotech* I: 87-91
- Snow M, Cox SL, Jenkin G, Trounson A, Shaw J. 2002. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* 297: 2227
- Steel RGD, Torrie JH. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Penerjemah Soemantri. Jakarta: Gramedia.
- Sumarmin R, Winarto A, Yusuf TL, Boediono A. 2007. Evaluasi periode transplantasi ovarium domba secara intrauterus pada kelinci *pseudopregnant*. *Sainstek* 9: 209-215
- Techakumphu M, Wintenberger-Torres S, Sevellec C. 1987. Survival of rabbit embryos after synchronous or asynchronous transfer. *Anim Reprod Sci* 12: 297-304
- Tilly J. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1: 162-172
- Tilly J. 1998. Molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad In Lokshin *et al.* (Ed) *When Cells Die*. Toronto, Canada: Wiley-Liss. Pp. 431-452
- Yulnawati. 2006. Optimalisasi produksi embrio domba secara *in vitro*: penggunaan medium CR1aa dan pengaruh status reproduksi ovarium. *Thesis*. Bogor Institut Pertanian Bogor.