

# **DINAMIKA FOLIKEL OVARIUM DOMBA PASCATRANSPLANTASI INTRAUTERIN PADA KELINCI PSEUDOPREGNANST**

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

1. Jurusan Biologi, FMIPA Univ. Negeri Padang, PADANG 25131 .

2. Dep. Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, FKH IPB BOGOR 16680.

3. Dep. Klinik, Reproduksi dan Patologi, FKH IPB BOGOR 16680.

## **ABSTRAK**

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengevaluasi dinamika folikel pada ovarium domba pascatransplantasi secara intrauterin pada kelinci pseudopregnansi. Transplantasi dilakukan pada kelinci *pseudopregnant* hari ke 1 atau ke 7. Ovarium kembali diambil pada hari ke 5, 7, atau 9 setelah transplantasi. Untuk menentukan dinamika folikel pada ovarium domba pascatransplantasi dan menghitung jumlah folikel pada berbagai tahap perkembangan, ovarium domba pascatransplantasi dijadikan preparat histologis dengan metode parafin dan pewarnaan HE. Hasilnya masih ditemukan semua tahapan perkembangan folikel (folikel primordial, primer, preantral, dan antral) pada semua kelompok perlakuan. Jumlah folikel pada 5, 7 atau 9 hari pascatransplantasi menurun nyata ( $p < 0,05$ ) kecuali jumlah folikel primordial pada kelompok 5 hari pascatransplantasi ( $634,7 \pm 56,88$ ) tidak berbeda nyata dengan kontrol ( $683,7 \pm 61,55$ ). Dapat disimpulkan bahwa dinamika folikel ovarium domba pascatransplantasi pada kelinci pseudopregnansi masih dapat ditemukan pada semua kelompok perlakuan.

*Kata kunci: dinamika folikel, pascatransplantasi intrauterus, ovarium domba*

## **THE FOLLICLE DYNAMICS OF EWE OVARIAN POST- INTRAUTERINE TRANSPLANTATION TO PSEUDOPREGNANCY RABBIT**

### **ABSTRACT**

The objective of this study was to evaluate the follicle dynamics of ewe ovarium post-intrauterine transplantation to pseudopregnant rabbit. The experiment was concerned with the 1<sup>st</sup> or 7<sup>th</sup> days of pseudopregnancy to receive the ewe ovarium. After 5, 7, and 9 days transplantation the ewe ovarium were recollected. In order to determine the follicle dynamics of ewe ovarium post-intrauterine transplantation and to count the number of each stage, the ewe ovarium was prepared using the paraffin methods and staining with HE. The results showed all stages of the follicle dynamics (Primordial, Primary, Preantral and Antral follicle stages) were still found in all groups of treatment. The number of follicles decreased significantly ( $p < 0.05$ ) except the number of Primordial follicles of the 5 days post transplantation ( $634.7 \pm 56.88$ ) was not significantly different ( $p < 0.05$ ) compared to the control group ( $683.7 \pm 61.55$ ). It could be concluded that the follicle dynamics of ewe ovarium post-intrauterine

transplantation in pseudopregnancy rabbit still found in all groups of the treatment.

*Key word: follicle dynamics, post-intrauterin transplantation, ewe ovarium*

## PENDAHULUAN

Ovarium pada hewan betina merupakan gudang dan tempat produksi oosit. Setiap ovarium mengandung oosit dalam jumlah yang sangat banyak, tetapi hanya sedikit sekali dari jumlah oosit tersebut yang dimatangkan dan diovulasikan selama masa subur atau pada masa reproduktif (Gilbert, 1994). Meskipun secara *in vitro* atau superovulasi dapat dihasilkan oosit matang (*mature oocytes*) dalam jumlah yang lebih banyak, dari jumlah itu masih sedikit sekali oosit yang dapat difertilisasi (Liu *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002).

Salah satu teknik yang dikembangkan untuk preservasi ovarium adalah dengan cara transplantasi ovarium intraspecies atau interspecies baik dari ovarium yang segar maupun ovarium yang telah dibekukan (Parkening *et al.*, 1985; Gunasena *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Cushman *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002). Pada transplantasi interspecies, diharapkan akan terjadi proses pengaktifan folikel primordial, pematangan inti dan sitoplasma oosit secara sempurna. Metode ini merupakan salah satu alternatif pemecahan permasalahan untuk preservasi ovarium sebagai sumber gamet (Cushman *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002).

Transplantasi ovarium secara autologus pada tikus yang berumur 23 hari memperlihatkan bahwa ovarium yang berasal dari tikus yang masih belum dewasa (*immature*) yang ditransplantasikan memperlihatkan adanya revaskularisasi pembuluh darah. Ovarium kembali memiliki kemampuan untuk mengontrol sekresi gonadotropin melalui mekanisme umpan balik negatif hormon steroid dalam waktu satu minggu setelah transplantasi meskipun belum terjadi anastomosis pembuluh darah (Dissen *et al.*, 1994).

Transplantasi interspecies lainnya dilakukan secara intrauterus oleh Kagabu and Umezu (2001). Ovarium mencit yang sudah dibekukan dan kemudian di-*thawing* berhasil ditransplantasikan ke dalam rongga uterus tikus. Pada penelitian ini, ditemukan banyak folikel yang berkembang dengan baik. Folikel tersebut

semakin banyak ditemukan jika sebelum transplantasi interspesies dilakukan, pada tikus resipien terlebih dahulu diinfus atau ditransfusikan cairan darah mencit.

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, tiga minggu kemudian *dithawing* dan ditransplantasikan secara autologus pada daerah pelvis, ternyata mampu kembali berperan dalam produksi FSH dan mencapai keadaan normal setelah empat bulan kemudian. Pada domba tersebut, secara normal juga terjadi perkawinan dan kebuntingan (Gosden *et al.*, 1994).

Evaluasi terhadap histologis ovarium domba yang ditransplantasikan secara intrauterus pada kelinci pseudopregnansi perlu dilakukan sebagai dasar untuk melakukan penelitian tentang viabilitas oosit domba yang berasal dari ovarium pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi. Hal ini juga dapat digunakan sebagai dasar untuk kepentingan konservasi, *embryo rescue*, dan *gamete banking* (bank gamet).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji berbagai tingkat perkembangan folikel ovarium domba pascatransplantasi di dalam uterus kelinci pseudopregnansi. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap penerapan dan pengembangan teknologi transplantasi ovarium interspesies terutama yang dilakukan dalam rangka preservasi dan optimalisasi pemanfaatan ovarium.

## **MATERI DAN METODE**

### **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Unit Rehabilitasi Reproduksi (URR) Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, dan Laboratorium Histologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, dari bulan Agustus 2004 sampai dengan bulan Januari 2005.

### **Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga rentang waktu transplantasi yang berbeda masing-masing 5, 7, atau 9 hari. Setiap kelompok perlakuan dilakukan dengan ulangan sebanyak 10 kali.

## **Materi Penelitian**

### **1. Hewan Percobaan**

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci betina jenis New Zealand White yang telah dewasa kelamin dengan berat badan 2,5 – 3. Untuk mendapatkan kelinci betina bunting semu atau *pseudopregnant* hari pertama, pada kelinci betina dilakukan ulas vagina (kopulasi tiruan) pada pukul lima pagi dan empat jam setelah kopulasi tiruan; kelinci dapat dijadikan sebagai resipien.

Kandang kelinci yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang individual yang terbuat dari kawat dengan ukuran 75 cm panjang x 40 cm lebar x 50 cm tinggi. Setiap kandang dilengkapi masing-masing dengan tempat pakan dan tempat minum. Pakan berupa butiran (*pellet*) diberikan sebanyak 150 gram/ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*

### **2. Penyediaan ovarium domba untuk 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 ditempatkan dalam *Petri dish* yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi antibiotik penisilin G 100 IU/ml.

### **3. Penyediaan kelinci resipien dan teknik transplantasi**

Kelinci betina resipien selanjutnya dianestesi dengan menginjeksikan 20 mg ketamin/kg b.b. (Ilium, NSW, 100 mg ketamin/mL) dan selang 10 menit kemudian dengan 2 mg xylazine/kg b.b. (Ilium, NSW, 20 mg xylazine/mL) yang dilakukan secara intramuskular. Setelah teranestesi, kelinci diletakkan di atas bak bedah dan dicukur rambut di sekitar daerah *linea alba* serta bagian yang akan dibedah diusap dengan alkohol 70% (Techakumphu *et al.*, 1987; Forcada and Lopez, 2000).

Pembedahan dilakukan pada daerah *linea alba* sepanjang 3 – 4 cm (kulit, otot perut, dan *peritoneum*). Selanjutnya dibuat insisi pada punggung uterus sepanjang 1 cm. Melalui celah insisi tersebut, dimasukkan potongan jaringan ovarium domba dan didorong ke arah kornua uteri. Transplantasi potongan

jaringan ovarium dilakukan empat buah untuk setiap kornua uteri kelinci. Setelah ovarium domba ditransplantasikan, insisi pada uterus dijahit dan setelah itu dilakukan juga penjahitan terhadap *peritoneum*, otot perut, dan kulit untuk menutup luka. Sesudah proses penjahitan luka selesai, di atas jahitan tersebut dioleskan betadine dan kelinci dipindahkan kembali ke kandangnya menjelang siuman. Kelinci resipien kemudian dipelihara kembali dan agar tidak terjadi infeksi dilakukan pengolesan betadine setiap pagi dan sore hari.

#### **4. Pembuatan preparat histologis ovarium domba pascatransplantasi**

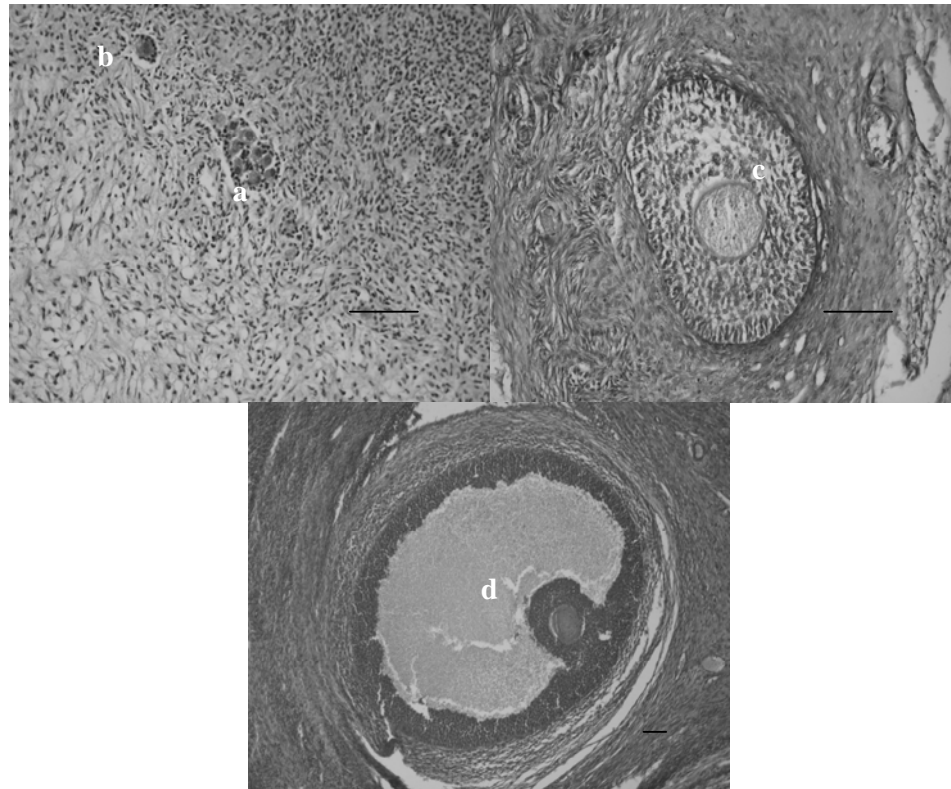
Ovarium domba pascatransplantasi yang dikoleksi kembali pada hari ke 5, 7, atau 9 serta kontrol (ovarium segar) kemudian difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam. Pengerjaan pembuatan preparat selanjutnya dilakukan sesuai dengan Metode Parafin dan pewarnaan Hematoksin-Eosin (HE). Pengamatan dan penghitungan data hasil penelitian berupa jumlah folikel dalam berbagai tingkat perkembangan yaitu : folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel antral dilakukan dengan bantuan mikroskop binokuler dan hand tally counter.

#### **Analisis Data**

Data yang didapatkan selanjutnya diuji secara statistik dengan uji Anova dan jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan dengan uji DNMRT (Steel and Torrie, 1993). Lebih lanjut, deskripsi tingkat perkembangan folikel didasarkan pada buku acuan Dasar-Dasar Histologi (Junqueira & Carneiro, 1991).

### **HASIL**

Dari percobaan yang telah dilakukan untuk mengetahui keadaan dinamika folikel (folikel dalam berbagai tingkat perkembangan) serta jumlah rerata folikel pada ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi, didapatkan hasil sebagaimana yang terlihat pada Gambar 1 dan tabulasi pada Tabel 1 berikut ini.



Gambar 1. Berbagai tingkat perkembangan folikel : a. Folikel Primordial, b. Folikel Primer, c. Folikel Preantral, d. Folikel Antral. Bar=100 $\mu$

Pada Gambar 1, dapat diketahui bahwa berbagai tingkat perkembangan folikel masih dapat ditemukan pada seluruh perlakuan transplantasi. Pada Gambar 1a, dapat dilihat bahwa kelompok folikel primordial masih dapat terwarnai dengan jelas dengan inti berwarna gelap dan sitoplasma berwarna lebih terang. Keadaan folikel primordial terwarnai dengan baik dengan HE dan dikelilingi oleh sel-sel granulosa (berwarna ungu) yang merupakan sel-sel pengiring selama proses pematangan.

Pada Gambar 1b, terlihat folikel dengan tahapan perkembangan folikel primer yang ditandai oleh adanya beberapa lapis sel granulosa dan pembentukan zona pelusida (area bening di sekitar oosit). Baik folikel primordial maupun folikel primer dapat dijumpai pada setiap preparat seri yang diamati.

Pada Gambar 1c, dan d, dapat dilihat hasil pewarnaan HE pada sayatan preparat ovarium domba yang memperlihatkan tingkat perkembangan folikel preantral (c) dan antral (d). Folikel preantral ditandai oleh belum terbentuknya

rongga antrum, sedangkan pada folikel antral ditandai oleh adanya rongga antrum yang berisi cairan antrum. Pada seluruh perlakuan, masih ditemukan folikel preantral dan antral dalam keadaan baik (beberapa lapis sel granulosa yang rapi, zona pelusida dengan batas yang jelas, inti dan sitoplasma terwarnai HE dengan baik).

Tabel 1. Rerata jumlah berbagai tingkat perkembangan folikel dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci

Pascatrans- plantasi (hari)	Rerata Jumlah Folikel/Ovarium				Jumlah Total (dari 10 ovr)
	Primordial	Primer	Preantral	Antral	
0 (kontrol)	(683,7±61,55)a	(452,2 ±41,46)a	(38,8±4,73)a	(5,7 ±1,83)a	11.808
5	(634,7±56,88)a	(345,1±43,57)b	(32,6±3,67)b	(5,4±0,84)b	10.178
7	(532,4±46,66)b	(240,1±35,30)c	(19,0±2,87)c	(3,2±1,03)c	7.947
9	(198,0±54,65)c	(70,6±22,94)d	(7,0±3,02)d	(1,2±1,34)d	2.768

Keterangan : Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu kolom, tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $p < 0,05$

Dari Tabel 1, diketahui bahwa jumlah rerata folikel primordial yang dapat ditemukan pada perlakuan ovarium domba yang ditransplantasi intrauterin pada kelinci selama lima hari tidak berbeda nyata ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok kontrol, yaitu masing-masing  $683,7 \pm 61,55$  dan  $634,7 \pm 56,88$ . Rerata jumlah folikel primordial yang ditemukan pada perlakuan ovarium domba yang ditransplantasikan selama tujuh hari ditemukan menurun nyata ( $p < 0,05$ ) yaitu  $532,4 \pm 46,66$  jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan transplantasi ovarium domba selama lima hari dan kelompok kontrol. Rerata jumlah folikel primordial pada perlakuan transplantasi ovarium domba selama sembilan hari yaitu  $198,0 \pm 54,65$  menurun nyata ( $p < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan ketiga kelompok perlakuan lainnya. Namun, untuk folikel primer ditemukan penurunan yang nyata ( $p < 0,05$ ) sejalan dengan lama waktu ovarium domba ditransplantasikan jika dibandingkan dengan kontrol

Rerata jumlah folikel preantral ditemukan menurun sejalan dengan lamanya waktu transplantasi ovarium domba secara intrauterin pada kelinci. Penurunan jumlah folikel sekunder terjadi secara nyata ( $p < 0,05$ ) dengan berturut-turut rerata jumlah pada kelompok perlakuan lima hari transplantasi ( $32,6 \pm 3,67$ ),

tujuh hari transplantasi ( $19,0 \pm 2,87$ ), dan sembilan hari transplantasi ( $7,0 \pm 3,02$ ) jika dibandingkan dengan kelompok kontrol ( $38,8 \pm 4,73$ ). Penurunan rerata jumlah folikel preantral pada kelompok perlakuan yang sejalan dengan lamanya waktu transplantasi membuktikan terjadinya proses autolisis meskipun pada kelompok lima hari perlakuan proses ini tidak terjadi secara cepat sebagaimana yang ditemui pada kelompok perlakuan tujuh dan sembilan hari transplantasi.

Rerata jumlah folikel antral juga ditemukan menurun nyata ( $p < 0,05$ ) sejalan dengan lamanya waktu ovarium domba ditransplantasikan intrauterin pada kelinci. Secara berturutan penurunan yang terjadi tersebut yaitu rerata jumlah folikel antral perlakuan lima hari transplantasi  $5,4 \pm 0,84$  ; perlakuan tujuh hari transplantasi dengan rerata jumlah folikel antral  $3,2 \pm 1,03$ , dan rerata  $1,2 \pm 1,34$  folikel antral untuk perlakuan sembilan hari, sedangkan pada kelompok kontrol  $5,7 \pm 1,83$ . Penurunan rerata jumlah folikel 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 antral yang ada pada saat ditransplantasikan dan berada dekat dengan lokasi pemotongan akan lebih mudah menjadi kolaps karena sebagian besar sel-selnya berdegenerasi.

Secara umum, dapat ditemukan terjadinya penurunan jumlah folikel pada berbagai tingkat perkembangan kecuali rerata jumlah folikel primordial pada perlakuan lima hari transplantasi yang tidak berbeda nyata dengan rerata jumlah folikel primordial kelompok kontrol. Penyebab terjadinya penurunan rerata jumlah folikel tersebut umumnya disebabkan oleh rusaknya jaringan epitel ovarium, degenerasi sel-sel folikel, dan degenerasi jaringan korteks dan medula ovarium domba yang ditransplantasikan.

## **PEMBAHASAN**

Hasil ini memperlihatkan bahwa kemampuan transplantasi intrauterin secara interspesies antara domba dan kelinci memiliki peluang untuk dapat menjadi mediator pemindahan ovarium dari satu daerah ke daerah lain yang memiliki sarana dan prasarana teknologi reproduksi berbantuan untuk tindak lanjutnya. Meskipun demikian masih perlu dilakukan uji fertilisasi untuk menentukan apakah folikel-folikel tersebut masih bisa difertilisasi atau tidak.



Berdasarkan pengamatan histologis pada semua perlakuan transplantasi, masih ditemukan folikel-folikel dengan zona pelusida yang utuh dan memiliki inti yang utuh pula. Kemungkinan keadaan metabolisme folikel-folikel tersebut didukung oleh adanya sekreta atau nutrisi yang berasal dari endometrium kelinci pseudopregnansi.

Meskipun secara umum ditemukan rerata jumlah folikel primordial yang menurun sejalan dengan lama waktu transplantasi, dari hasil uji statistik terhadap data yang diperoleh, ternyata kelompok perlakuan lima hari transplantasi memiliki rerata jumlah folikel primordial yang tidak berbeda nyata jika dibandingkan kelompok kontrol. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh masih utuhnya struktur epitel yang melindungi bagian korteks sehingga struktur korteks yang masih baik ini dapat menopang tetap berlangsungnya metabolisme sel-sel primordial secara normal. Namun, sumber energi diperkirakan berasal dari sekreta uterus kelinci yang diambil secara difusi oleh epitel ataupun bagian lainnya. Sejak awal kebuntingan, kelenjar yang terdapat pada endometrium uterus kelinci aktif menghasilkan dan mengeluarkan sekreta ke dalam lumen uterus sebagai cadangan nutrisi untuk embrio menjelang terjadinya implantasi (Colby, 1986). Dengan adanya sumber energi ini, sekaligus dapat dicegah atau diperlambat proses autolisis pada ovarium domba yang ditransplantasikan.

Terjadinya penurunan jumlah rerata folikel primordial secara nyata pada kelompok perlakuan tujuh dan sembilan hari transplantasi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol dan perlakuan lima hari transplantasi umumnya disebabkan oleh rusaknya struktur epitel yang melindungi bagian korteks. Akibat kerusakan epitel ovarium lebih lanjut adalah tidak dapat dikontrolnya metabolisme sel-sel folikel primordial yang terdedah secara langsung pada sekreta uterus kelinci yang kemungkinan juga mengandung senyawa tertentu yang tidak bisa ditolerir keberadaannya oleh folikel primordial. Hal lain yang juga mungkin menyebabkan menurunnya rerata jumlah folikel primordial adalah proses autolisis pada jaringan korteks ovarium domba yang ditransplantasikan. Hal ini ditandai oleh ditemukannya agregat protein hasil pelepasan beberapa sel atau agregat protein yang berwarna di antara sel-sel bagian korteks pada kelompok perlakuan tujuh dan sembilan hari transplantasi, tetapi tidak ditemukan pada kelompok kontrol. Diduga sebagian agregat protein yang ditemukan pada bagian korteks

tersebut juga berasal dari degenerasi folikel primordial.

Penurunan rerata jumlah folikel 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 antral yang ada pada saat ditransplantasikan dan berada dekat dengan lokasi pemotongan akan lebih mudah menjadi kolaps karena sebagian besar sel-selnya berdegenerasi.

Terjadinya penurunan jumlah folikel pada berbagai tingkat perkembangan kecuali rerata jumlah folikel primordial pada perlakuan lima hari transplantasi, yang tidak berbeda nyata dengan rerata jumlah folikel primordial kelompok kontrol merupakan keadaan yang perlu ditelaah lebih lanjut. Terjadinya penurunan rerata jumlah folikel tersebut umumnya disebabkan oleh rusaknya jaringan epitel ovarium, degenerasi sel-sel folikel, dan degenerasi jaringan korteks dan medula ovarium domba yang ditransplantasikan.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut ini.

1. Pada transplantasi interspesies ovarium domba secara intrauterin pada kelinci, masih dapat ditemukan folikel primordial, folikel primer, folikel preantral, dan folikel antral.
2. Transplantasi intrauterin ovarium domba pada kelinci hingga hari ke lima tidak berpengaruh terhadap jumlah folikel primordial.
3. Transplantasi intrauterin ovarium domba pada kelinci mengakibatkan terjadinya penurunan jumlah folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder, dan folikel antral sejalan dengan lamanya waktu transplantasi

Perlu dilakukan kajian lebih lanjut tentang viabilitas dari oosit yang mungkin masih dapat dikoleksi dari ovarium pascatransplantasi secara *in vitro*.

## **UCAPAN TERIMAKASIH**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Hibah Tim Pascasarjana DIKTI tahun 2005 – 2007 yang telah mendanai penelitian ini.

## **DAFTAR PUSTAKA**

- Colby ED. 1986. The Rabbit dalam *Current Therapy in Theriogenology* 2. Morrow DA. Editor. WB Saunders Co. Philadelphia.
- Cushman RA, Wahl CM, and 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(1), 48 – 54.
- Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, and 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(3), 1146 -1153.
- Forcada F, and Lopez M. 2000. Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbit. *Anim Reprod Scie.* 64,121 – 126.
- Gilbert F. Scott. 1994. *Developmental Biology.* 4<sup>th</sup> edition. Sinauer Association, Inc. Sunderland, Massachusetts. P. 803-805.
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K, and Webb R. 1994a. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *Reprod Fertil.* 101, 619 – 623.
- Gosden RG, Baird DT, Wade JC, and Webb R. 1994b. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovaries autografts stored at -196 degrees C. *Human Reprod.* 9(4), 597 – 603.
- Gunasena KT, Lakey JR, Vilines PM, Critser ES, and Critser JK. 1997. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod.* 57(2), 226 – 231.
- Gunasena KT, Lakey JR, Vilines PM, Bush M, Raath C, Critser ES, Mc Gann LE, and Critser JK. 1998. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved African elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci.* 53, 265 – 175.
- Hafez ESE. 1970. *Reproduction and Breeding techniques for Laboratory Animal.* Lea and Febiger. Philadelphia.
- Junqueira LC, and Corneiro J. 1991. *Histologi Dasar.* Edisi 2. Penerjemah Adji Dharma. EGC.Jakarta.
- Kagabu S, and Umezu M. 2001. Effect of blood transfusion on the survival rate of cryopreserved mouse ovaries transplanted into rat uterine cavity. *Mamm Ova Res.* 18, 58 – 61.
- Kim SS, Radford J, Harris M, Varley J, Rutherford A, Lieberman B, Shalet S, and Gosden R. 2001. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be save for autotransplantation. *Biol Reprod.* 16(10), 2056 – 2060.
- Liu J, Van der EJ, Van den BR, Dumortier F, and Dhont M. 2000. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and *in vitro* culture. *Biol Reprod.* 62, 1218 – 1223.
- Liu J, Van der EJ, Van den BR, and Dhont M. 2002. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reprod.* 17(3), 605 – 611.
- Parkening TA, Collins TJ, and Elder FFB. 1985. Orthotopic ovarian transplantations in young and aged C57BL/6J mice. *Biol Reprod.* 32, 989 – 997.
- Snow M, Cox SL, Jenkin G, Trounson A, and Shaw J. 2002. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science.* 297, 2227.
- Steel RGD and Torrie JH. 1993. *Prinsip Dan Prosedur Statistik.* Penerjemah Soemantri. Gramedia. Jakarta.
- Techakumphu M, Wintenberger-Torres S, and Sevellec C. 1987. Survival of rabbit embryos after synchronous or asynchronous transfer. *Anim Reprod Scie.* 12, 297 – 304.