

# VIABILITAS OOSIT DOMBA PASCATRANSPLANTASI OVARIUM DOMBA DALAM UTERUS KELINCI *PSEUDOPREGNANT*

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

Telah dilakukan penelitian untuk mengetahui viabilitas oosit domba yang dikoleksi dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterus pada kelinci *pseudopregnant*. Ovarium domba ditransplantasikan dalam uterus kelinci *pseudopregnant* pada hari pertama bunting semu dan kemudian diambil kembali setelah lima (P5) atau tujuh (P7) hari transplantasi. Sebagai kontrol digunakan ovarium segar. Oosit dikoleksi dari ovarium pascatransplantasi dengan metode *slicing* (pencacahan) di dalam media *phosphate buffer saline* (PBS) yang disuplementasi dengan 5% *fetal bovine serum* (FBS) dan 100 IU penicillin-streptomisin/ml. Oosit hasil koleksi selanjutnya dimaturasi dalam *Tissue Culture Medium* (TCM)-199 yang disuplementasi dengan 10% FBS, 10 IU *follicle stimulating hormone* (FSH)/ml dan 100 IU penicillin-streptomisin/ml. Oosit selanjutnya diinkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub>, dengan kandungan CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 38°C, selama 24 jam. Setelah dimaturasi, oosit diwarnai dengan aceto-orcein 2% untuk menentukan status inti oosit. Hasilnya memperlihatkan bahwa oosit yang mampu mencapai tahapan perkembangan dengan status inti M-II setelah maturasi pada P5 (35,05%) dan P7 (35,24%) nyata lebih sedikit ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol (56,65%). Dapat disimpulkan bahwa viabilitas oosit domba pascatransplantasi di dalam uterus kelinci *pseudopregnant* masih ditemukan meskipun persentasenya lebih rendah.

*Kata kunci: oosit, viabilitas, pascatransplantasi intrauterus, maturasi, M-II*

## EWE OOCYTE VIABILITY FROM EWE OVARIAN AFTER INTRAUTERINE TRANSPLANTATION TO PSEUDOPREGNANT RABBIT

### ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the ewe oocyte viability from ewe ovary after intrauterine transplantation to pseudopregnant rabbit. The ewe ovary was transplanted intrauterine on day 1 to pseudopregnant rabbit and oocytes recollected on five (P5) or seven (P7) days posttransplantation. The fresh ovary was used as the control. The oocytes were collected from the ovaries by slicing method in Phosphate Buffer Saline (PBS) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS), and 100 IU/ml of penicillin-streptomycin. Oocytes were matured in Tissue Culture Medium (TCM)-199 supplemented with 10% FBS, 10 IU/ml of Follicle Stimulating Hormone (FSH), and 100 IU/ml of penicillin-streptomycin. Oocytes were incubated in CO<sub>2</sub> incubator with 5% CO<sub>2</sub>, 38°C for 24 h. After maturation, the oocytes were stained with 2% aceto-orcein to determine the nuclear oocytes status. The result showed that the oocytes could reach the M-II phase from P5 (35.05%) and P7 (35.24%) decreased significantly ( $p < 0.05$ ) compared to the control (56.65%). However it can be concluded that the oocytes viability still preserved intrauterine in pseudopregnant rabbit.

*Key word: oocytes, viability, post-intrauterin transplatation, maturation, M-II*

### PENDAHULUAN

Ovarium pada hewan betina merupakan gudang dan tempat produksi oosit. Potensi oosit yang terdapat pada ovarium mamalia nonprimata pada saat dilahirkan diperkirakan mencapai 200.000 oosit. Pada masa re-

produktif atau masa subur tidak semua oosit tersebut yang dimatangkan dan diovulasikan (Gilbert, 1994; Gordon, 1994). Untuk meningkatkan jumlah oosit yang dapat dimanfaatkan dari suatu ovarium berbagai teknik terus dikembangkan termasuk teknik preservasi terhadap ovarium. Salah satu teknik yang dikembangkan adalah

preservasi ovarium dengan cara transplantasi ovarium intraspecies atau interspecies baik dari ovarium yang segar maupun ovarium yang telah dibekukan (Parkening *et al.*, 1985; Dissen *et al.*, 1994; Gunasena *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Cushman *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002).

Teknologi reproduksi berbantuan telah banyak dikembangkan dan dilakukan untuk memecahkan permasalahan reproduksi dan juga untuk melakukan preservasi ovarium sebagai sumber gamet betina pada hewan-hewan yang terancam punah atau hewan ternak betina genetik unggul. Meskipun secara *in vitro* atau superovulasi dapat dihasilkan oosit matang (*mature oocytes*) dalam jumlah yang lebih banyak, namun dari jumlah itu masih sedikit sekali oosit yang dapat difertilisasi. Hal ini memperlihatkan adanya keterbatasan dalam maturasi oosit secara *in vitro* (Gosden *et al.*, 1994b; Liu *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002).

Salah satu usaha untuk mendapatkan oosit matang secara *in vivo* adalah melalui teknik transplantasi ovarium. Pada transplantasi interspecies diharapkan akan terjadi proses pengaktifan folikel primordial, pematangan terhadap inti, dan sitoplasma oosit secara sempurna. Metode ini merupakan salah satu alternatif pemecahan masalah untuk preservasi ovarium sebagai sumber gamet (Kagabu dan Umezu, 2001; Cushman *et al.*, 2002; Snow *et al.*, 2002).

Pematangan oosit baik secara *in vivo* maupun *in vitro* meliputi pematangan inti dan sitoplasma merupakan proses yang menentukan keberhasilan fertilisasi *in vitro* (Rehman *et al.*, 2001). Beberapa medium yang umum digunakan pada proses pematangan atau maturasi oosit antara lain *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199) dan *Potassium Simplex Optimized Medium* (KSOM). Untuk mengoptimalkan proses maturasi *in vitro* pada medium ditambahkan serum, hormon gonadotrophin dan antibiotik (Accardo *et al.*, 2004).

Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA yang ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke metafase II (M-II). Membran inti akan menyatu dengan vesikel membentuk *germinal vesicle* (GV) dan selanjutnya terjadi pelepasan membran inti (*Germinal Vesicle Break Down* atau GVBD). Oosit yang telah melewati GVBD selanjutnya memasuki tahap metafase I (M-I) setelah 12 – 14 jam inkubasi dan diikuti oleh tahap anafase I (A-I), telofase I (T-I) setelah 14 – 18 jam inkubasi. Oosit mencapai tahap metafase II (M-II) setelah 24 jam inkubasi yang ditandai dengan terbentuknya badan kutub I (*Polar Body I* atau PB-I). Oosit yang berada pada tahap M-II inilah yang siap untuk difertilisasi (Pawshé *et al.*, 1994; Chohan dan Hunter, 2003).

Sel-sel kumulus memiliki peranan penting pada

proses maturasi oosit secara *in vitro* dan berpengaruh terhadap kualitas embrio yang dihasilkan. Proses pematangan oosit akan terhambat jika sel-sel kumulus telah dilepaskan sebelum maturasi. Sel-sel kumulus berperan penting pada proses transkripsi dan sintesis protein sebelum terjadinya GVBD pada oosit domba dan sapi. Selain itu pada saat terjadinya ekspansi, sel-sel kumulus juga berfungsi sebagai fasilitator pelepasan *Cumulus Oophorus Complex* (COC) dari dinding folikel sehingga terjadi ovulasi. Ekspansi sel-sel kumulus juga dijadikan dasar untuk keberhasilan IVM (Trounson, 1992; dan Setiadi, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui viabilitas oosit domba yang dikoleksi dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci *pseudopregnansi* secara *in vitro*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap program *gamete rescue* sebagai salah satu alternatif model preservasi dan optimalisasi pemanfaatan ovarium terutama untuk tujuan konservasi.

## MATERI DAN METODE

### Penyediaan ovarium domba untuk donor

Ovarium domba hasil koleksi dari RPH Ciampea ditempatkan dalam wadah yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi dengan penisilin G 100 IU/ml. Setelah sampai di laboratorium dibersihkan dari jaringan lain yang menyertainya pada saat koleksi dengan menggunakan gunting dan pinset. Ovarium yang telah bersih dibelah menjadi empat bagian dan untuk sementara potongan ovarium tersebut ditempatkan dalam *petridish* yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi antibiotik penisilin G 100 IU/ml.

### Penyediaan kelinci resipien dan teknik transplantasi

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 40 ekor kelinci betina jenis New Zealand White yang telah dewasa kelamin dengan bobot badan 2,5–3 kg. Untuk mendapatkan kelinci betina bunting semu 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.

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 kelinci teranestesi diletakkan di atas bak bedah dan dicukur rambut di sekitar daerah *linea alba* serta diusap bagian yang akan dibedah dengan alkohol 70% (Techakumphu *et al.*, 1987; Forcada dan Lopez, 2000).

Pembedahan dilakukan pada daerah *linea alba* sepanjang 3–4 cm (kulit, otot perut dan *peritoneum*). Kemudian dilanjutkan dengan membuat 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. Setelah proses penjahitan luka selesai, di atas jahitan tersebut dioleskan betadine dan kelinci dipindahkan kembali ke kandangnya menjelang siuman.

### Koleksi oosit dan maturasi *in vitro*

Oosit dikoleksi dari ovarium segar (kontrol) dan ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci selama lima atau tujuh hari. Oosit dikoleksi menurut metode Jaswandi *et al.* (2001) dengan cara mencacah bagian korteks ovarium menggunakan pisau bedah steril ukuran 20. Koleksi oosit dilakukan dengan menggunakan larutan *dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (dPBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) yang disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) 5% dan penisilin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Oosit hasil koleksi dicuci dalam medium koleksi dan medium maturasi masing-masing sebanyak dua kali. Selanjutnya oosit dimaturasi pada medium Tissue Culture Medium (TCM-199; Sigma, USA) yang disuplementasi FBS 10%, *Follicle Stimulating Hormone* (FSH; Antrin<sup>®</sup>, Denka Pharmaceutical Co., Kawasaki, Japan) 10 IU/ml dan penisillin-streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) 100 IU/ml. Pematangan oosit dilakukan dalam medium maturasi berbentuk drop masing-masing 50 µl untuk 10-15 oosit dan ditutupi dengan mineral *oil* (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, pada suhu 38°C selama 24 jam.

### Penentuan status inti dengan pewarnaan aceto-orcein

Setelah maturasi selama 24 jam, status inti oosit dievaluasi dengan cara melepaskan sel-sel kumulus dengan bantuan enzim hialuronidase (Sigma, USA) 0,25% dan dilanjutkan dengan cara memipet berulang-ulang dengan pipet berdiameter 100-110 µm. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus diletakkan pada drop KCL 0,9% di atas objek glass, kemudian difiksir dengan kaca penutup yang mempunyai bantalan parafin dan vaselin (1 : 9) pada keempat sudutnya. Sediaan oosit selanjutnya difiksasi dalam larutan fiksasi asam asetat dan etanol (1 : 3) selama tiga hari. Setelah itu sediaan oosit diwarnai

dengan aceto-orcein 2% selama 5 menit. Kemudian larutan pewarna dibilas dengan asam asetat 25% dan keempat sisi kaca penutup diberi larutan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi inti dengan mikroskop fase kontras.

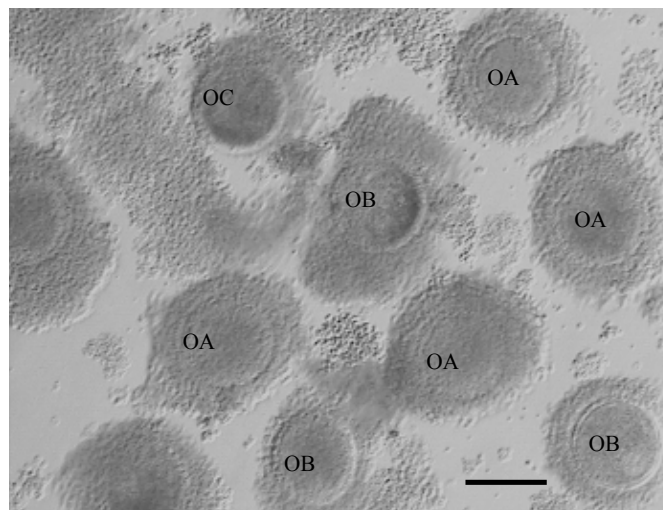
Status inti oosit dikelompokkan menjadi *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), metafase I (M-I) dan metafase II (M-II). GVBD ditandai dengan robeknya membran inti dan inti sudah tidak terlihat jelas, M-I ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang ekuator dan M-II ditandai dengan adanya badan kutub I dan susunan kromosom yang sama dengan M-I. Oosit hasil maturasi yang telah matang akan berada pada tahap M-II.

### Analisis Data

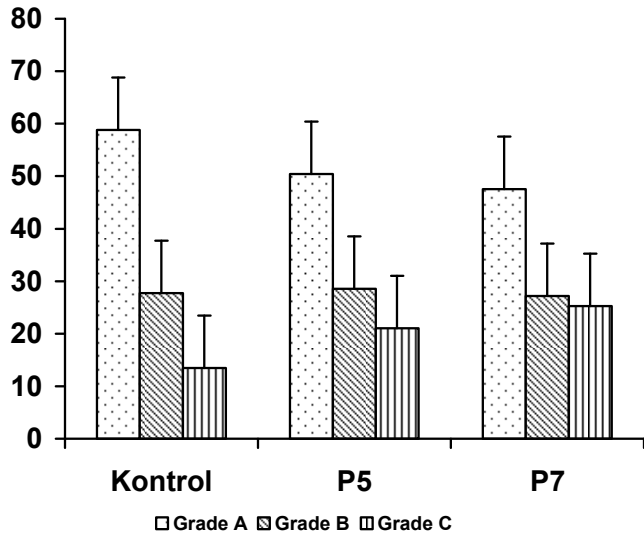
Data yang didapatkan pada penelitian ini selanjutnya dianalisis dengan analisis sidik ragam (ANOVA) dan jika didapatkan perbedaan yang nyata dilakukan uji lanjut DNMRT (Steel dan Torrie, 1993).

## HASIL

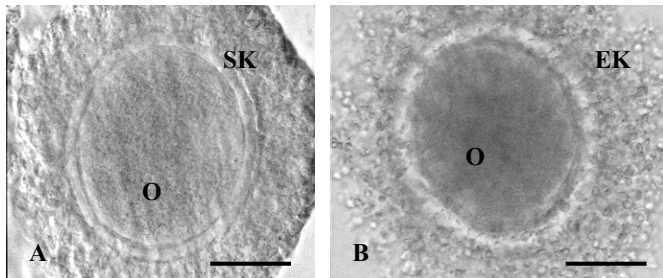
Maturasi oosit bertujuan untuk mematangkan oosit sehingga menghasilkan oosit sekunder haploid yang memiliki komponen sel yang diperlukan pada saat fertilisasi dan perkembangan embrio nantinya. Tahapan awal dari proses maturasi *in vitro* ini adalah mengoleksi oosit dari ovarium (Gambar 1). Oosit hasil koleksi ini dapat dikategorikan (grade) pada oosit grade A, yaitu oosit yang memiliki beberapa lapisan sel-sel kumulus yang tebal dan kompak disekelilingnya, sitoplasma oosit konsisten seragam dan cerah, oosit grade B adalah oosit yang memiliki beberapa lapisan sel-sel kumulus yang agak tipis, kompak dan sitoplasma oosit konsisten seragam



Gambar 1. Oosit hasil koleksi dari ovarium domba pada berbagai grade (kualitas), OA: oosit grade A, OB: oosit grade B, dan OC: oosit grade C. Bar = 100µm



Gambar 2. Persentase oosit hasil koleksi dari ovarium domba pada berbagai kualitas atau grade sebelum proses maturasi in vitro

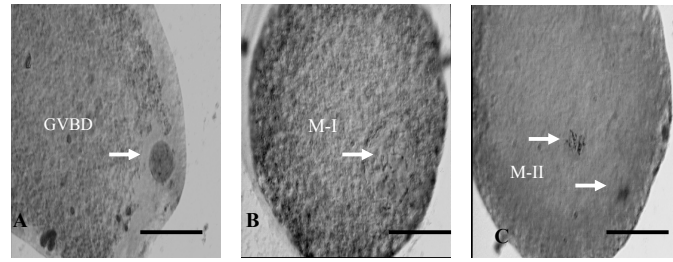


Gambar 3. Perkembangan oosit domba in vitro. A. Oosit domba sebelum mengalami pematangan yang ditandai dengan struktur sel-sel kumulus yang kompak, B. Oosit domba setelah maturasi in vitro yang ditandai dengan ekspansi sel-sel kumulus (struktur sel-sel kumulus yang longgar). O: Oosit, SK: sel kumulus, EK: ekspansi sel kumulus. Bar = 50µm

dan cerah, sedangkan oosit grade 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 samasekali) dan sitoplasma berwarna agak gelap.

Pada Gambar 2 dapat diketahui bahwa terjadi penurunan persentase jumlah oosit grade 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 grade B tidak berbeda nyata antarperlakuan tetapi pada persentase oosit grade C ditemukan peningkatan nyata ( $p < 0,05$ ) pada lima hari pascatransplantasi (21,01) dan tujuh hari pascatransplantasi (25,24) dibandingkan kontrol (13,45).

Selanjutnya hasil pengamatan yang dilakukan terhadap proses maturasi oosit domba setelah 24 jam inkubasi dapat pula dibedakan antara kultur yang



Gambar 4. Status inti oosit setelah maturasi in vitro dan diwarnai dengan aceto-orcein. Tanda panah menunjukkan status inti oosit pada tahapan: A. GVBD, B. M-I dan C. M-II. Bar = 50µm

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit domba yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi

Pasca trans-plantasi	Jumlah oosit	Status inti (%)			
		GVBD	M-I	M-II	TI
Kontrol	119	21 (17,65%) <sup>b</sup>	27 (22,69%) <sup>b</sup>	68 (57,68%) <sup>a</sup>	3 (2,52%)
P5	119	32 (26,89%) <sup>a</sup>	38 (31,92%) <sup>a</sup>	45 (37,82%) <sup>b</sup>	4 (3,36%)
P7	103	29 (28,16%) <sup>a</sup>	35 (33,98%) <sup>a</sup>	33 (32,03%) <sup>c</sup>	6 (5,83%)

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

berhasil atau tidak berhasil dengan mengamati ada tidaknya ekspansi sel-sel kumulus (Gambar 3). Pada penelitian ini ditemukan ekspansi sel-sel kumulus baik pada oosit yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi 5 atau 7 hari maupun pada kelompok kontrol.

Tahapan pematangan inti oosit domba pascatransplantasi lima hari dan tujuh hari serta kelompok kontrol secara *in vitro* yang diamati pada penelitian ini adalah GVBD (*Germinal Vesicle Break Down*), M-I (Metafase I) dan M-II (Metafase II) (Gambar 4). Sedangkan hasil pematangan inti oosit domba yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi dalam medium TCM-199 terlihat pada Tabel 1.

Oosit yang mencapai tahap M-II pada kelompok kontrol (57,68%) lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) jika dibandingkan dengan kelompok lima hari pascatransplantasi (37,82%) dan tujuh hari pascatransplantasi (32,02%). Persentase jumlah oosit yang mencapai tahap M-I pada kelompok lima hari pascatransplantasi (31,92%) dan tujuh hari pascatransplantasi (33,98%) lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kontrol (22,69%). Demikian pula halnya dengan oosit yang tertahan pada tahapan GVBD yang ditemukan pada lima hari pascatransplantasi (26,89%) dan tujuh hari pascatransplantasi (28,16%) lebih tinggi ( $p < 0,05$ ) dibandingkan dengan kelompok kontrol (17,65%).

## PEMBAHASAN

Perbedaan persentase jumlah oosit yang mampu mencapai tahap M-II ini diduga karena sebagian besar oosit yang dimaturasi dari kelompok lima hari pascatransplantasi dan tujuh hari pascatransplantasi mengalami penurunan viabilitas karena selama transplantasi kekurangan energi dan juga 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 kekurangan energi 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 lima hari pascatransplantasi (31,92%) dan tujuh hari pascatransplantasi (33,98%) jauh lebih banyak dibandingkan kontrol (22,69%). Keadaan ini masih memberikan kemungkinan untuk meningkatkan persentase jumlah oosit yang mencapai M-II pada lima hari pascatransplantasi atau tujuh hari pascatransplantasi dengan cara melengkapi medium dengan suplemen hormon estrogen, 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 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).

Persentase jumlah oosit domba pada lima hari pascatransplantasi dan tujuh hari pascatransplantasi yang lebih rendah dari kontrol kemungkinan juga disebabkan tidak seragamnya kualitas oosit hasil koleksi untuk dimaturasi. Persentase jumlah oosit grade C pada lima hari pascatransplantasi dan tujuh hari pascatransplantasi 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).

Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa oosit yang berasal dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterus (dalam uterus) pada kelinci yang bunting semu atau *pseudopregnant* sampai 5 atau 7 hari pascatransplantasi masih bisa diperoleh oosit matang tahap M-II meskipun jumlahnya lebih sedikit

dari pada kontrol.

Dari hasil penelitian ini disarankan untuk dilakukannya penelitian tentang viabilitas oosit domba pascatransplantasi yang dimaturasi dengan lama waktu yang berbeda dan medium kultur yang disuplementasi hormon gonadotrophin yang berbeda untuk meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap M-II serta kemampuan oosit untuk difertilisasi secara *in vitro*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

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

## DAFTAR PUSTAKA

- Accardo C, Dattena M, Pilichi S, Chessa B, Cappai P. 2004. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes, embryos development and viability. *Anim Reprod Sci.* 81: 77-86.
- Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocytes quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 71 (3-4): 143-155.
- Chohan KR, Hunter HG. 2003. Meiotic competence of bovine fetals oocytes following in vitro maturation. *Anim Reprod Sci.* 76: 43-51.
- Colby ED. 1986. The rabbit in 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 Sci.* 64,121 – 126.
- Gilbert F. Scott. 1994. *Developmental Biology.* 4<sup>th</sup> edition. Sinauer Association, Inc. Sunderland, Massachusetts. P. 803-805.
- Gordon I. 1994. *Laboratory production of cattle embryos.* Dublin, CAB International. Pp. 30-142; 277-290.
- 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.
- Jaswandi, Boediono A, Setiadi MA. 2001. In vitro maturation and fertilization of ovine oocytes in system with absence of 5% CO<sub>2</sub>. *Reprotech.* I(1): 19-22.

- 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.
- Niwa K. 1993. Effectiveness of *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization technique in pigs. *Reprod Fert. Suppl.* 48: 49-59.
- Parkening TA, Collins TJ, and Elder FFB. 1985. Orthotopic ovarian transplantations in young and aged C57BL/6J mice. *Biol Reprod.* 32, 989 – 997.
- Pawshe CH, Appa Rao KBC, Jain SK, Totey SM. 1994. Biochemical studies on goat oocytes: timing of nuclear progression, effect of protein inhibitor and pattern of polypeptide synthesis during maturation. *Theriogenology.* 42: 307-320.
- Rehman NU, Sarwar M, Samad HA. 2001. In vitro production of bovine embryos-a review. *Asian-Aus. Anim Sci.* 14: 1342-1351.
- Setiadi MA. 2002. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocytes *in vitro.* *Reprotech.* I (2): 87-91.
- 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.* Penterjemah Soemantri. Gramedia. Jakarta.
- Techakumphu M, Wintenberger-Torres S, and Sevellec C. 1987. Survival of rabbit embryos after synchronous or asynchronous transfer. *Anim Reprod Sci.* 12, 297 – 304.
- Trounson AO. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro.* *Anim Reprod Sci.* 28: 125-137.
- Yulnawati. 2006. Optimalisasi produksi embrio domba secara *in vitro*: penggunaan medium CR1aa dan pengaruh status reproduksi ovarium. [*Thesis*]. Bogor. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.