

## Perbandingan Siklus Estrus, Bobot Uterus, dan Periode Bunting Semu pada Mencit yang Mengalami Autotransplantasi Ovarium di Subkutan dan Subkapsula Ginjal

### *Comparison of Oestrous Cycle, Uterine Weight, and Length of Pseudopregnancy of Mice After Ovary Autografted in Subcutaneous and Under the Kidney Capsule*

KUSDIANTORO MOHAMAD\*, IRFAN F. RAMADHAN, ITA DJUWITA, ARIEF BOEDIONO

Departemen Anatomi, FKH, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 8 Maret 2004/Disetujui 4 April 2004

The aim of this study was to compare oestrous cycle, uterine weight and length of pseudopregnancy of mice after ovary autografted in subcutaneous and under the kidney capsule. The experiment were drawn up as follow: experiment I, 2-3 months of age female DDY mice with normal oestrous cycles were grouped on sham surgery without autografted (control, n=12), subcutaneous autografted ovaries (n=12), and under kidney capsule autografted ovaries (n=12). Oestrous cycles were examined daily and on day 30, mice were sacrificed, uterine were weighed, and ovary were prepared for histological evaluation. In experiment II, mice were grouped as previous: control (n=11), subcutaneous autografted ovaries (n=15), and under kidney capsule autografted ovaries (n=11). Daily examination of copulation and length of pseudopregnancy were observed. The first oestrous cycle under kidney capsule group (day-6 post surgery) was faster than that of subcutaneous (day-10 post surgery) ( $P < 0.05$ ). There were no differences of oestrous length cycle and uterine weight in all groups. Ovarian examination showed follicles at different stages of development, both in subcutaneous and under kidney capsule group. Length of pseudopregnancy under kidney capsule group ( $12.25 \pm 2.12$  days) was not different compare to control group ( $12.18 \pm 1.40$  days), however it was longer than that of subcutaneous ( $9.09 \pm 2.17$  days,  $P < 0.05$ ). It was concluded that grafting ovary under the kidney capsule was better than that of subcutaneous, i.e. on oestrous recovery and length of pseudopregnancy.

#### PENDAHULUAN

Teknik transplantasi ovarium telah banyak dilakukan dalam rangka penelitian biomedis dan upaya konservasi satwa langka. Pada manusia, pengembangan transplantasi ovarium dilakukan dalam upaya menyelamatkan ovarium pasien kanker yang akan menjalani terapi kimiawi maupun radiologi (Newton 1998; Oktay *et al.* 1998). Terapi ini dapat merusak sel telur yang terdapat di ovarium sehingga menyebabkan infertilitas pascaterapi pada kebanyakan pasien (Meirow & Nugent 2001). Tingkat kerusakan bergantung pada dosis terapi yang digunakan (Averette *et al.* 1990). Akhir-akhir ini terjadi peningkatan nyata pada tingkat kesembuhan pasien kanker yang menjalani terapi sehingga perlu diupayakan alternatif bagi kelangsungan fungsi reproduksinya (Meirow & Nugent 2001). Alternatif lain, selain penyimpanan embrio atau sel telur beku ialah pembekuan dan transplantasi ovarium (Newton 1998; Oktay *et al.* 1998; Meirow & Nugent 2001). Melalui teknik pengambilan dan pembekuan ovarium sebelum terapi, kemudian mengembalikan ovarium dengan teknik transplantasi setelah terapi (jika berhasil sembuh), diharapkan tidak hanya

sel telur yang dapat dihasilkan, akan tetapi juga terjadi pemulihan sekresi hormonal. Keuntungan lain menggunakan teknik ini ialah tidak diperlukan lagi terapi hormon eksogenus pascaterapi yang kadang membawa efek samping pada fisiologi tubuh.

Pada hewan, beberapa galur hewan laboratorium infertil atau subfertil telah dipelihara kelangsungan keturunannya melalui teknik transplantasi ovarium (Sztein *et al.* 1998). Penggunaan galur hewan laboratorium yang tidak memiliki kekebalan tubuh (seperti *severe combined immunodeficient [SCID] mice*) telah membuka peluang yang luas bagi upaya transplantasi beda spesies (*xenotransplantation*) (Gosden *et al.* 1994). Berbagai jenis ovarium hewan seperti domba (Gosden *et al.* 1994), kucing (Gosden *et al.* 1994), gajau (Gunasena *et al.* 1998), manusia (Oktay *et al.* 2000; Gook *et al.* 2001), marsupial (Mattiske *et al.* 2002), serta sapi (Senbon *et al.* 2003) berhasil ditransplantasikan di daerah subkutan maupun subkapsula ginjal hewan imunodefisiensi. Meskipun terdapat beberapa lokasi untuk transplantasi ovarium di luar bursa ovarium, seperti di rongga peritoneum (Callejo *et al.* 1999) dan endometrium hewan bunting (Kagabu & Umezu 2000), tetapi subkutan dan subkapsula ginjal merupakan dua daerah yang paling banyak digunakan. Transplantasi di subkutan dan subkapsula ginjal tidak memungkinkan hewan

\*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-421823,  
E-mail: kusm20@yahoo.com

tersebut mengalami fertilisasi *in vivo* dan bunting seperti halnya transplantasi di bursa ovarium (Candy *et al.* 2000), tetapi kedua lokasi ini sering dipilih untuk keperluan penelitian.

Transplantasi ovarium di subkutan dan subkapsula ginjal masing-masing memiliki keuntungan dan kelemahan (Weissman *et al.* 1999; Abir *et al.* 2003). Transplantasi subkutan relatif mudah dilakukan dan memiliki ruang yang luas untuk transplantasi ovarium yang lebih besar atau untuk perkembangan ovarium hewan yang memiliki ukuran folikel de Graaf yang besar. Sebaliknya, transplantasi ovarium di subkapsula ginjal secara teknik lebih sulit dan memiliki ruang yang relatif terbatas. Selain itu, upaya pengambilan sel telur dari ovarium yang ada di subkapsula ginjal memerlukan bedah laparotomi sedangkan pada subkutan tidak memerlukannya. Meskipun demikian, sistem vaskularisasi di ginjal jauh lebih baik dibandingkan dengan subkutan sehingga akan mempercepat persembuhan ovarium dan perkembangan folikel pascatransplantasi.

Meskipun transplantasi ovarium di subkutan dan subkapsula ginjal telah banyak dilakukan secara terpisah, akan tetapi membandingkan kedua lokasi transplantasi ini secara langsung baru dilaporkan oleh beberapa peneliti. Subkapsula ginjal dilaporkan lebih baik dibandingkan dengan subkutan dari segi jumlah dan perkembangan folikel pascatransplantasi (Abir *et al.* 2003; Van den Broecke *et al.* 2001). Akan tetapi, penelitian yang membandingkan keberhasilan kedua lokasi ini berdasarkan pada siklus estrus, bobot uterus, maupun kemampuan hewan melakukan kopulasi dan mengalami bunting semu belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan membandingkan lokasi transplantasi di subkutan dan subkapsula ginjal berdasarkan pada parameter di atas yang dapat menggambarkan secara tak langsung keberadaan dan aktivitas hormon estrogen yang dihasilkan oleh folikel yang berkembang. Untuk mendukung data tersebut juga dilakukan pengamatan secara histologi pada ovarium hasil transplantasi.

## BAHAN DAN METODE

**Hewan Percobaan.** Hewan percobaan yang digunakan ialah mencit (*Mus musculus albinus*) betina galur DDY umur 2-3 bulan yang memiliki siklus estrus normal. Mencit dipelihara dengan periode gelap dan terang 12 jam:12 jam dan diberi pakan dan minum *ad libitum*.

**Autotransplantasi Ovarium di Subkutan.** Transplantasi ovarium di subkutan dilakukan mengikuti Mohamad *et al.* (2003). Mencit terlebih dahulu dibius dengan larutan yang mengandung 0.3 mg xilazin dan 1.5 mg ketamin per ekor secara intraperitoneal. Setelah terbius, kulit daerah punggung disayat dan jaringan subkutan dikuakkan. Ovarium kiri dicapai melalui sayatan di dinding abdomen sebelah kiri di daerah legok lapar (*flank*). Bantalan lemak ditarik sehingga ovarium beserta tuba Fallopii dan kornua uteri keluar dari rongga abdomen. Ovarium beserta bursanya diambil untuk menghindari ada bagian ovarium yang tersisa. Selanjutnya, kornua uteri dan tuba Fallopii dikembalikan ke dalam rongga abdomen. Ovarium kanan diambil dengan cara serupa. Kemudian, ovarium dibersihkan dari sisa bursa ovarium, dicuci dalam NaCl

fisiologi, dan disimpan di atas balok es sampai saat dilakukan transplantasi. Selanjutnya pembuluh darah subkutan di daerah punggung disayat sehingga terjadi pendarahan. Setiap ovarium dibelah menjadi dua dan disisipkan pada daerah pendarahan pada sisi tubuh yang sama. Penyayatan pembuluh darah subkutan dan pemotongan ovarium menjadi dua dimaksudkan untuk membantu dan merangsang pembentukan pembuluh darah yang baru. Selanjutnya kulit dijahit dan diberi antibiotik untuk persembuhan.

**Autotransplantasi Ovarium di Subkapsula Ginjal.** Transplantasi ovarium di subkapsula ginjal dilakukan seperti di subkutan dengan beberapa perbedaan. Sayatan di dinding abdomen dibuat tepat di atas ginjal, lebih ke dorsomedial dibandingkan dengan sayatan untuk ovariektomi pada autotransplantasi di subkutan. Sayatan dibuat sebesar ginjal, lebih kurang 1-1.5 cm. Ovarium dikeluarkan dan diambil seperti cara pada autotransplantasi di subkutan. Selanjutnya, ginjal dikeluarkan dengan cara menekan bagian ventral abdomen sehingga ginjal keluar melalui bidang sayatan dan berada di luar rongga abdomen. Kapsula ginjal dicubit menggunakan pinset halus dan dibuat sayatan tanpa melukai korteks ginjal dengan panjang sayatan sebesar ovarium yang akan dimasukkan (1-2 mm). Ovarium yang telah dibersihkan dan dibelah dua, disisipkan melalui bidang sayatan dengan permukaan ovarium yang disayat melekat pada kortek ginjal. Setelah belahan ovarium berada di bawah kapsula ginjal, ovarium didorong menggunakan pinset tumpul menjauhi bidang sayatan guna mencegah ovarium keluar kembali dari subkapsula ginjal. Selanjutnya ginjal dikembalikan ke dalam rongga abdomen, kulit dijahit, dan bekas sayatan diberi antibiotik untuk persembuhan.

Untuk hewan normal atau kontrol, dilakukan bedah semu dengan semua prosedur sama seperti pada transplantasi kecuali tanpa pengambilan ovarium.

**Siklus Estrus.** Siklus estrus diperiksa dengan metode ulas vagina (*vaginal smear*) dan diwarnai dengan Giemsa 10%. Pemeriksaan sitologi ulas vagina dilakukan dengan mikroskop cahaya. Penentuan fase siklus dari hasil ulas vagina dilakukan seperti yang dilaporkan oleh Redina *et al.* (1994), yaitu berdasarkan pada keberadaan dan jumlah kualitatif sel-sel epitel vagina. Fase proestrus ditunjukkan oleh keberadaan sel-sel epitel superfisial berinti, fase estrus ditunjukkan oleh keberadaan sel-sel epitel superfisial yang mengalami pertandukan (*cornified cells*), fase metestrus ditunjukkan oleh keberadaan sel-sel pertandukan dan sel-sel darah putih, dan fase diestrus ditunjukkan oleh keberadaan sel-sel darah putih.

**Histoteknik.** Untuk memastikan apakah ovarium yang ditransplantasikan memiliki folikel yang berkembang atau tidak, maka dibuat preparat histologi. Jaringan ovarium yang dikoleksi dari hewan yang telah dimatikan (sebelumnya dibius) difiksasi dalam larutan Bouin (campuran asam pikrat jenuh : formalin : asam asetat glasial = 15:5:1) selama 24 jam. Setelah itu jaringan didehidrasi dalam alkohol dan dijernihkan dalam xilol, lalu dimasukkan dalam parafin. Jaringan dalam parafin disayat dengan mikrotom dengan ketebalan 5  $\mu$ m dan sayatan dilekatkan pada gelas obyektif. Selanjutnya, preparat dikeringkan selama satu malam dalam inkubator pada suhu 40 °C. Preparat

kemudian dideparafinisasi dalam xilol, direhidrasi dalam alkohol, dan diwarnai dengan hematoxilin-eosin (HE). Hasil yang diperoleh diamati dan difoto menggunakan mikroskop cahaya yang telah dilengkapi dengan alat fotografi.

**Rancangan Percobaan dan Pengamatan.** Penelitian ini disusun dalam rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan, yaitu: bedah semu tanpa autotransplantasi (kontrol), autotransplantasi ovarium di subkutan, dan autotransplantasi ovarium di subkapsula ginjal.

Pada percobaan pertama sebanyak 36 mencit dengan 12 ekor untuk setiap perlakuan diperiksa siklus estrus setiap hari selama 30 hari pascabedah (autotransplantasi). Pada hari ke-30 pascabedah, mencit dimatikan, bobot uterus ditimbang, ovarium difiksasi dan dibuat preparat histologinya. Konfirmasi bahwa siklus estrus yang terjadi disebabkan oleh ovarium yang ditransplantasi atau tidak dilakukan secara histologi dengan melihat perkembangan folikel yang ada.

Percobaan kedua menggunakan 37 mencit, terdiri atas 11 ekor untuk kontrol, 15 ekor untuk perlakuan subkutan, dan 11 ekor untuk perlakuan subkapsula ginjal. Tujuh hari setelah bedah (memberi kesempatan untuk persembuhan), mencit dicampur dengan pejantan vasektomi untuk mencit kontrol atau pejantan normal untuk mencit autotransplantasi dengan perbandingan 1:1 (*single mating*). Siklus estrus dan kopulasi diamati setiap hari selama 30 hari pascabedah jika mencit telah mengalami minimal dua kali kopulasi, atau selama 45 hari jika mencit hanya mengalami satu kali kopulasi atau tidak pernah kopulasi. Kopulasi ditentukan berdasarkan pada keberadaan sumbat vagina (*vaginal plug*, berupa bagian padat seperti keju yang terdapat di liang vagina) yang diamati pada pagi hari (pukul 06.00-07.00 WIB). Mencit yang memiliki sumbat vagina telah melakukan perkawinan atau kopulasi. Periode bunting semu ditentukan berdasarkan pada jarak antara dua kopulasi. Keadaan bunting semu diperkuat atau dihubungkan dengan gambaran siklus estrus.

**Analisis Data.** Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (ANOVA) atau *General Linear Models Procedure* (GLMP) pada selang kepercayaan 95% ( $P = 0.05$ ) menggunakan program SAS 6.12.

## HASIL

**Siklus Estrus.** Pemeriksaan siklus estrus mencit pascabedah pada kelompok kontrol menunjukkan bahwa siklus berlangsung seperti sebelum bedah. Sedangkan pada kelompok autotransplantasi, siklus mulai menghilang rata-rata pada hari ke-3 pascabedah. Fase estrus pascabedah muncul pertama kali lebih cepat pada kelompok subkapsula ginjal (hari ke-6 pascabedah) dibandingkan dengan kelompok subkutan

(hari ke-10 pascabedah) ( $P < 0.05$ ). Adapun panjang rata-rata satu siklus estrus dan fase estrus pada kedua kelompok transplantasi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1).

**Morfologi Ovarium setelah Transplantasi.** Keberadaan ovarium mencit secara makroskopi pada kelompok subkutan dan subkapsula ginjal pada hari ke-30 pascatransplantasi menunjukkan pertumbuhan vaskularisasi dan perkembangan ovarium (Gambar 1). Ovarium kelompok subkutan tumbuh dilindungi oleh suatu jaringan ikat sedangkan ovarium kelompok subkapsula ginjal tumbuh di bawah kapsula dan melekat langsung pada korteks ginjal. Vaskularisasi ovarium oleh pembuluh darah subkutan jelas teramati secara makroskopi pada kelompok subkutan, sebaliknya vaskularisasi pada ovarium kelompok subkapsula ginjal tidak dapat teramati secara makroskopi. Vaskularisasi ovarium pada subkapsula ginjal langsung disuplai oleh korteks ginjal yang kaya dengan pembuluh kapiler dan glomerulus. Pengamatan mikroskopi menunjukkan perkembangan folikel pada semua kelompok (Gambar 2), meskipun secara kualitatif terjadi penurunan jumlah folikel per bidang sayatan pada kelompok autotransplantasi jika dibandingkan dengan kontrol.

**Bobot Uterus.** Penimbangan bobot uterus menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada ketiga kelompok, yaitu  $0.185 \pm 0.041$ ,  $0.210 \pm 0.044$ , dan  $0.175 \pm 0.041$  g masing-masing secara berurutan untuk kelompok kontrol, subkutan, dan subkapsula ginjal (Gambar 3).

**Kopulasi dan Periode Bunting Semu.** Terdapat perbedaan kemampuan kopulasi pada ketiga kelompok. Semua mencit kontrol mampu melakukan kopulasi setelah dicampur dengan pejantan vasektomi, 87% mencit kelompok subkutan dan 91% mencit kelompok subkapsula ginjal mampu melakukan kopulasi dengan pejantan normal. Mencit yang mampu melakukan kopulasi tidak semuanya menunjukkan dua kali kopulasi atau lebih, yaitu 100%, 85%, dan 80% masing-masing untuk mencit kontrol, subkutan, dan subkapsula ginjal. Periode bunting semu pada kelompok subkapsula ginjal tidak berbeda dibandingkan dengan kontrol, tetapi lebih panjang dibandingkan dengan subkutan ( $P < 0.05$ ) (Tabel 2). Pemeriksaan ulas vagina menunjukkan gambaran fase metestrus pada hari ditemukan sumbat vagina dan fase diestrus (anestrus) pada hari-hari berikutnya. Kopulasi kedua kebanyakan terjadi pada fase estrus pertama setelah periode bunting semu dengan atau tanpa didahului oleh fase proestrus. Hewan yang tidak berkopulasi tetap menunjukkan siklus estrus dan fase estrus. Beberapa mencit yang tidak berkopulasi, terutama pada kelompok subkutan, menunjukkan fase estrus yang diperpanjang (tiga sampai lima hari) dibandingkan dengan satu atau dua hari pada mencit kontrol.

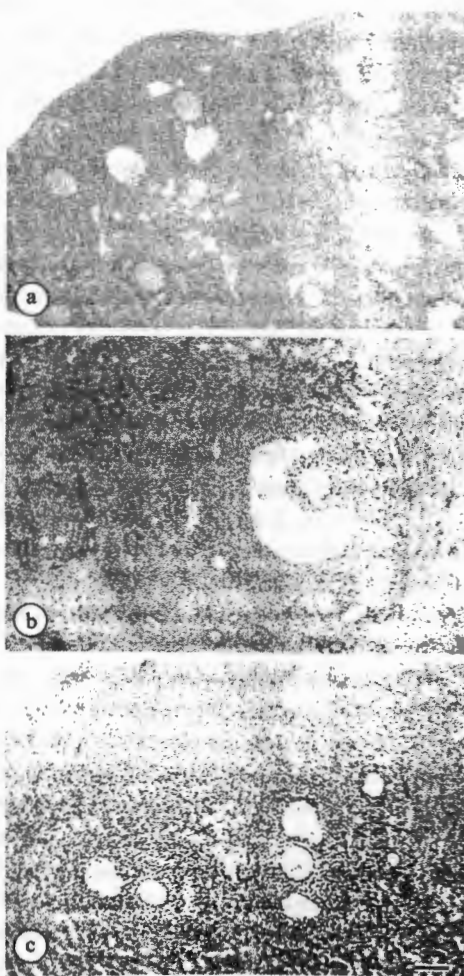
Tabel 1. Siklus estrus mencit pada kelompok kontrol, autotransplantasi ovarium di subkutan dan di subkapsula ginjal

kelompok	n	Waktu siklus menghilang (hari ke- pascabedah)	Waktu siklus muncul (hari ke- pascabedah)	Panjang siklus (hari)	Panjang fase estrus (hari)
Kontrol	12	*	*	$4.82 \pm 0.72a$	$1.65 \pm 0.90a$
Subkutan	12	$2.83 \pm 0.57a$	$9.75 \pm 2.34a$	$5.27 \pm 0.78a$	$2.21 \pm 0.72a$
Subkapsula ginjal	12	$2.75 \pm 0.45a$	$5.75 \pm 1.14b$	$5.32 \pm 0.67a$	$2.39 \pm 0.42a$

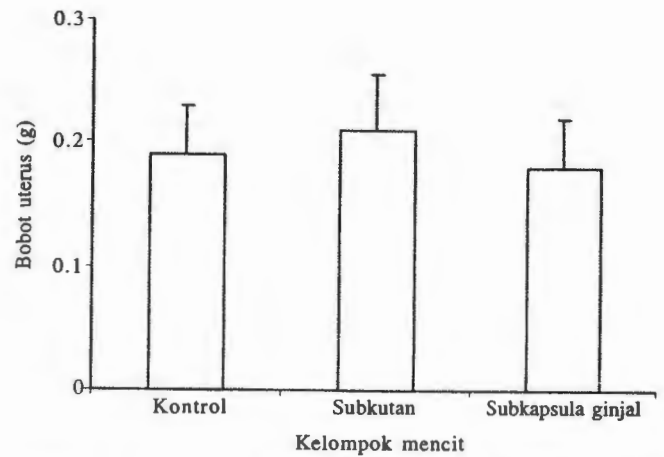
\*Siklus tetap berlangsung normal. Nilai dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ( $P < 0.05$ )



Gambar 1. Gambaran makroskopi ovarium pada hari ke-30 autotransplantasi. a. subkutan, b. subkapsula ginjal, tanda panah: ovarium, garis skala = 5 mm.



Gambar 2. Gambaran mikroskopi ovarium pada hari ke-30 pascabedah. a. kontrol (bedah semu), b. autotransplantasi di subkutan, c. autotransplantasi di subkapsula ginjal. Pewarnaan HE. Garis skala = 80  $\mu$ m.



Gambar 3. Bobot uterus mencit pada hari ke-30 pascabedah pada kelompok kontrol, autotransplantasi ovarium di subkutan dan autotransplantasi di subkapsula ginjal ( $P > 0.05$ ).

Tabel 2. Kemampuan kopulasi mencit kontrol, autotransplantasi ovarium di subkutan dan subkapsula ginjal

Kelompok	n	1 kopulasi (%)	$\geq 2$ kopulasi (%)	Periode bunting semu (rata-rata $\pm$ sd)
Kontrol	11	11/11 (100)	11/11 (100)	12.18 $\pm$ 1.40a
Subkutan	15	13/15 (87)	11/13 (85)	9.09 $\pm$ 2.17b
Subkapsula ginjal	11	10/11 (91)	8/10 (80)	12.25 $\pm$ 2.12a

Nilai dengan huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ( $P < 0.05$ )

### PEMBAHASAN

Perubahan epitel vagina atau siklus estrus dipengaruhi oleh aktivitas hormon estrogen (Fox & Laird 1970), oleh karena itu produksi hormon estrogen dapat dipantau melalui pemeriksaan perubahan sitologi ulas vagina. Hilangnya siklus estrus pada kelompok autotransplantasi subkutan dan subkapsula ginjal yang disebabkan oleh ovariectomi menunjukkan hilangnya estrogen atau paling tidak hilangnya efek estrogen pada epitel vagina yang mulai terlihat rata-rata pada hari ke-3 pascabedah. Hasil serupa dilaporkan pada mencit baik dengan atau tanpa perlakuan superovulasi sebelum ovariectomi (Mohamad *et al.* 2003). Ovarium transplan mulai menunjukkan aktivitas memproduksi estrogen yang efeknya terlihat pada perubahan epitel vagina, perubahan tersebut mulai teramati rata-rata pada hari ke-10 pascabedah pada kelompok subkutan. Hasil ini menunjukkan diperlukan waktu lebih kurang sepuluh hari untuk pemulihan fungsi ovarium menghasilkan estrogen. Hasil serupa juga dilaporkan oleh Weissman *et al.* (1999) dan Mohamad *et al.* (2003) bahwa fase estrus pertama muncul setelah transplantasi ovarium pada subkutan berkisar 9-14 hari pascabedah. Hasil ini merupakan manifestasi dari peningkatan produksi estrogen. Pada tikus, peningkatan konsentrasi estrogen dan penurunan konsentrasi *follicle stimulating hormone* (FSH) dilaporkan mulai terjadi pada hari ke-10 pascatransplantasi (Callejo *et al.* 1999).

Pada kelompok subkapsula ginjal, fase estrus pertama muncul lebih cepat dibandingkan dengan kelompok subkutan, yaitu rata-rata pada hari ke-6 pascabedah. Hal ini menunjukkan

bahwa proses persembuhan ovarium akibat proses tranplan terjadi lebih cepat, dengan demikian peningkatan produksi estrogen terjadi lebih awal. Pengamatan histologi pada hari ke-7 pascatransplantasi menunjukkan bahwa pada subkapsula ginjal ditemukan beberapa folikel tersier dan folikel de Graaf dengan morfologi normal, sebaliknya pada subkutan sebagian besar folikel tersier dan folikel de Graaf mengalami proses degenerasi (atresia) (Mohamad *et al.* 2002). Hal ini mengindikasikan bahwa fase estrus yang terjadi lebih awal pada kelompok subkapsula ginjal berasal dari folikel tersier atau de Graaf yang mampu selamat dari atresia. Atresia folikel pada ovarium tranplan terjadi akibat kondisi iskaemia, yaitu jaringan kekurangan oksigen karena belum mendapat suplai darah pada beberapa hari di awal transplantasi (Nugent *et al.* 1998). Sekitar 21% dari curah total darah jantung dipompa menuju ginjal (Guyton 1997), dengan demikian mempercepat pembentukan neovaskularisasi dan mengurangi efek iskaemia pada folikel pascatransplantasi.

Tidak terdapat perbedaan panjang siklus estrus dan fase estrus menunjukkan bahwa perlakuan autotransplantasi mampu memulihkan siklus estrus dan lokasi transplantasi tidak mempengaruhi panjang siklus estrus mencit selama pengamatan. Meskipun panjang siklus dan fase estrus kelompok autotransplantasi tidak berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol, tetapi terdapat kecenderungan lebih panjang pada kedua kelompok perlakuan tersebut. Meskipun belum dapat dipastikan apakah terdapat gangguan pada proses ovulasi dari folikel de Graaf, tetapi terdapat kemungkinan hambatan ovulasi secara mekanis oleh jaringan ikat (pada kelompok subkutan) atau kapsula (pada kelompok subkapsula ginjal), sehingga folikel de Graaf akan memproduksi estrogen dalam waktu yang lebih lama. Akibatnya fase estrus cenderung menjadi lebih panjang yang membawa konsekuensi siklus estrus juga diperpanjang.

Aktivitas estrogen pada bobot uterus juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang nyata pada ketiga kelompok. Hasil ini serupa dengan yang dilaporkan sebelumnya bahwa autotransplantasi ovarium pada tikus (Corleta *et al.* 1998) dan mencit (Mohamad *et al.* 2003) mampu mempertahankan bobot uterus dibandingkan dengan kelompok ovariektomi yang mengalami penurunan bobot uterus pascabedah. Pada uterus, estrogen menyebabkan proliferasi sel-sel endometrium, mempertahankan kontraktilitas, serta merangsang pembentukan dan sekresi kelenjar uterus (Hafez & Hafez 2000).

Aktivitas estrogen dalam memelihara siklus estrus dan bobot uterus diperkuat dengan pengamatan histologi ovarium tranplan pada akhir percobaan. Semua ovarium (baik kelompok subkutan maupun subkapsula ginjal) menunjukkan berbagai tahapan perkembangan folikel. Hasil ini menunjukkan efek estrogen yang diamati berasal dari folikel yang berkembang di ovarium yang ditransplantasikan. Secara kualitatif terlihat penurunan jumlah folikel per bidang sayatan pada kelompok autotransplantasi jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan jumlah folikel berkisar antara 26-55% pada ovarium tranplan dilaporkan oleh Nugent *et al.* (1998), Candy *et al.* (1997), Liu *et al.* (2002). Meskipun transplantasi dapat menyebabkan penurunan jumlah folikel,

akan tetapi tidak sampai mempengaruhi siklus estrus maupun bobot uterus pada mencit perlakuan.

Kemampuan folikel berkembang pada ovarium yang ditransplantasikan di luar bursa ovarium tidak hanya telah dilaporkan pada autotransplantasi (pada individu itu sendiri), tetapi juga pada xenotransplantasi (pada spesies yang berbeda). Transplantasi potongan korteks ovarium domba dan kucing mampu menunjukkan perkembangan folikel mencapai folikel tersier (folikel antral) setelah xenotransplantasi di subkapsula ginjal mencit imunodefisiensi (Gosden *et al.* 1994). Transplantasi potongan korteks ovarium manusia dapat mencapai tahap folikel antral setelah transplantasi di subkapsula ginjal mencit imunodefisiensi (Gook *et al.* 2001), bahkan sel telur yang berkembang di dalamnya mampu mencapai tahap metafase II dan mengalami ovulasi setelah induksi hormon *human chorionic gonadotrophin* (hCG) (Gook *et al.* 2003). Pada subkutan, autotransplantasi potongan ovarium manusia juga dilaporkan mencapai tahap folikel antral (Weissman *et al.* 1999). Transplantasi folikel sekunder sapi di subkapsula ginjal mencit juga mampu berkembang mencapai tahap folikel antral (Senbon *et al.* 2003). Kemampuan perkembangan folikel pada ovarium tranplan lebih jauh akan menghasilkan hormon estrogen (Callejo *et al.* 1999) yang berpengaruh pada organ reproduksi secara keseluruhan.

Lama periode bunting semu yang ditunjukkan oleh interval dua kopulasi yang berurutan menunjukkan kemampuan bunting semu mencit kelompok subkapsula ginjal lebih baik dibandingkan dengan mencit kelompok subkutan. Pada kelompok subkutan terdapat beberapa hewan yang mengalami kopulasi berikutnya pada fase estrus yang sama dan fase estrus tersebut terjadi cukup panjang. Selain itu periode bunting semu pada kelompok subkapsula ginjal lebih baik daripada kelompok subkutan serta tidak berbeda dibandingkan dengan kelompok kontrol. Panjang periode bunting semu pada mencit transplantasi ovarium di luar bursa belum pernah dilaporkan sebelumnya. Meskipun mencit yang mengalami transplantasi di luar bursa telah diketahui mampu melakukan kopulasi dan menunjukkan kemampuan bunting semu yang dipantau dari perubahan epitel vagina, tetapi kemampuan ovarium tranplan di luar bursa dalam mendukung suatu kebuntingan normal sampai saat ini belum diketahui. Beberapa upaya yang telah dilakukan oleh peneliti untuk melakukan transfer embrio pada resipien yang mengalami autotransplantasi ovarium subkutan gagal menghasilkan kebuntingan normal. Sedangkan upaya yang sama pada resipien yang mengalami autotransplantasi ovarium di subkapsula ginjal belum pernah dilakukan. Melihat bahwa lama bunting semu pada mencit subkapsula ginjal lebih baik dibandingkan dengan subkutan, maka perlu diteliti kemungkinan mencit yang mendapat transplantasi ovarium di subkapsula ginjal mampu mempertahankan kebuntingan setelah transfer embrio. Selain itu kemungkinan suplemen hormon eksogenus (seperti *luteinizing hormone*) dan progesteron) dapat meningkatkan keberhasilan kebuntingan pada hewan transplantasi di luar bursa masih perlu diteliti.

Gunasena *et al.* (1997) melaporkan semua mencit (100%) yang mendapat perlakuan bedah semu dan autotransplantasi

di bursa ovarium mampu melakukan perkawinan. Akan tetapi, yang berhasil bunting dan menghasilkan keturunan pada kopulasi pertama hanya 93% untuk bedah semu dan 75% untuk transplantasi di bursa ovarium. Meskipun demikian tidak diketahui apakah hasil ini berasal dari ovarium transplan atau dari sisa ovarium yang masih tertinggal di dalam bursa. Candy *et al.* (2000) menggunakan mencit yang memiliki isozim glukosa fosfat isomerase sebagai penanda donor menunjukkan 92% mencit yang mendapat transplantasi ovarium di bursa ovarium mampu melakukan perkawinan, tetapi hanya 62% menghasilkan keturunan yang berasal dari ovarium transplan. Hasil ini menunjukkan terdapat kemungkinan sebagian fertilitas berasal dari sisa ovarium. Pada penelitian ini, pemotongan ovarium beserta bursanya menyebabkan tidak ada kemungkinan tersisnya ovarium dan kemampuan kawin mencit benar-benar berasal dari ovarium yang ditransplantasikan.

Penggunaan teknik transplantasi ovarium, baik pada manusia maupun pada hewan, semakin menjanjikan di masa yang akan datang. Pada hewan, upaya konservasi hewan langka menggunakan teknik ini semakin mendekati kenyataan. Hal itu telah dibuktikan pada hewan percobaan. Transplantasi ovarium mencit di subkapsula ginjal tikus imunodefisiensi dan dilanjutkan dengan induksi hormon, koleksi sel telur, fertilisasi *in vitro*, dan transfer embrio telah berhasil menghasilkan anak (Snow *et al.* 2002). Pada manusia, pemindahan ovarium dari bursa ovarium ke subkutan daerah lengan telah didemonstrasikan (Oktay *et al.* 2003) dalam upaya menjauhkan ovarium dari tempatnya sehingga memungkinkan terapi radiologi dilakukan dengan aman. Penelitian lanjut pada spesies bukan hewan laboratorium serta manusia masih terus dilakukan untuk meningkatkan keefektifan dan keamanan teknik ini.

Hasil yang ditunjukkan pada penelitian ini, terutama pada kecepatan munculnya estrus dan kemampuan memelihara kebuntingan semu, meneguhkan kelebihan ginjal sebagai tempat untuk transplantasi ovarium di luar bursa ovarium. Jika tidak terdapat kekhususan di dalam penelitian, maka penggunaan transplantasi ovarium di subkapsula ginjal lebih dianjurkan dibandingkan dengan di subkutan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Bersaing X dengan kontrak kerja no. 013/LIT/BPPK-SDM/TV/2002.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abir R *et al.* 2003. Parameter affecting successful transplantation of frozen-thawed human fetal ovaries into immunodeficient mice. *Fertil Steril* 80:421-428.
- Averette HE, Boike GM, Jarrell MA. 1990. Effects of cancer chemotherapy on gonadal function and reproductive capacity. *CA Cancer J Clin* 40:199-209.
- Callejo J *et al.* 1999. Heterotopic ovarian transplantation without vascular pedicle in syngeneic Lewis rats: six-month control of estradiol and follicle-stimulating hormone concentrations after intraperitoneal and subcutaneous implants. *Fertil Steril* 72:513-517.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. 1997. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. *J Reprod Fertil* 110:11-19.
- Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. 2000. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. *Hum Reprod* 15:1300-1304.
- Corleta HE, Corleta O, Capp E, Eldeweiss MI. 1998. Subcutaneous autologous ovarian transplantation in Wistar rats maintains hormone secretion. *Fertil Steril* 70:16-19.
- Fox RR, Laird CW. 1970. Sexual Cycles. Di dalam: Hafez ESE (ed). *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Gook DA *et al.* 2003. Oocyte maturation, follicle rupture and luteinization in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 18:1772-1781.
- Gook DA, McCully BA, Edgar DH, McBain JC. 2001. Development of antral follicles in human cryopreserved ovarian tissue following xenografting. *Hum Reprod* 16:417-422.
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. 1994. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 101:619-623.
- Gunasena KT *et al.* 1998. Antral follicles develop in xenografted cryopreserved african elephant (*Loxodonta africana*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci* 53:265-275.
- Gunasena KT, Lakey JRT, Villines PM, Critser ES, Critser JK. 1997. Allogeneic dan xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol Reprod* 57:226-231.
- Guyton AC. 1997. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi 9. Tengadi KA (penerjemah). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Kagabu S, Umezumi M. 2000. Transplantation of cryopreserved mouse, chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp Anim* 49:17-21.
- Liu J, van der Elst J, van den Broecke R, Dhont M. 2002. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. *Hum Reprod* 17:605-611.
- Mattiske D, Shaw G, Shaw JM. 2002. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction* 123:143-153.
- Meirow D, Nugent D. 2001. The effect of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update* 7:535-543.
- Mohamad K, Budiarta K, Adnyane IKM, Djuwita I, Boediono A. 2003. Siklus estrus dan bobot uterus setelah autotransplantasi ovarium secara subkutan pada mencit yang diberi atau tanpa superovulasi. *Hayati* 10:100-105.
- Mohamad K, Djuwita I, Boediono A. 2002. Autotransplantasi dan vitrifikasi ovari dalam rangka konservasi dan rehabilitasi fungsi reproduksi. Laporan Penelitian Hibah Bersaing X/1. Dikti-Depdiknas.
- Newton H. 1998. The cryopreservation of ovarian tissue as a strategy for preserving the fertility of cancer patient. *Hum Reprod Update* 4:237-247.
- Nugent D, Newton H, Gallivan L, Gosden RG. 1998. Protective effect of vitamin E on ischaemia-reperfusion injury in ovarian graft. *J Reprod Fertil* 114:341-346.
- Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. 2003. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm. *Fertil Steril* 80:193-198.
- Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. 1998. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 69:1-7.

- Oktay K, Newton H, Gosden RG. 2000. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fertil Steril* 73:599-603.
- Redina OE, Amstislavsky SY, Maksimovsky LF. 1994. Induction of superovulation in DD mice at different stage of the estrus cycle. *J Reprod Fertil* 102:263-267.
- Senbon S, Ota A, Tachibana M, Miyano T. 2003. Bovine oocytes in secondary follicles grow and acquire meiotic competence in severe combined immunodeficient mice. *Zygote* 11:139-149.
- Snow M, Cox SL, Jenkin G, Trounson A, Shaw J. 2002. Generation of life young from xenografted mouse ovaries. *Science* 297:2227.
- Sztejn J, Sweet H, Farley J, Mobraaten L. 1998. Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: New approach in gamete banking. *Biol Reprod* 58:1071-1074.
- Van den Broecke R *et al.* 2001. Follicular growth in fresh and cryopreserved human ovarian cortical grafts transplanted to immunodeficient mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97:193-201.
- Weissman A *et al.* 1999. Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. *Biol Reprod* 60:1462-1467.