ANIMAL PRODUCTION, Mei 2008, hlm. 78 - 84 Vol. 10 • No.2 •
ISSN 1411 - 2027 • Terakreditasi No. 56/DIKTI/Kep/2005

Histologis Ovarium Domba Pascatransplantasi Intrauterin pada Kelinci Pseudopregnansi

(The Histological of Ewe Ovarium Post-Intrauterine Transplantation to Pseudopregnancy Rabbit)

Ramadhan Sumarmin[1], Arief Boediono[2], Adi Winarto[2], dan Tutty Laswardi Yusuf[2]

[1] *Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang*
[2] *Fakultas Kedokteran Hewan,Institut Pertanian Bogor*

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the histologycal of ewe ovarium post-intrauterin transplantation to pseudopregnancy rabbit. The experiment was concerned with the 1 or 7 days of pseudopregnancy to receive the ewe ovarian transplant. Post transplantation 5, 7 or 9 days of ewe ovarium were recollected. To determine histologically post-intrauterine transplantation of ewe ovarium, the histological preparat was prepared by the paraffin methods followed by HE staining. The result showed that there were follicle development with all stages of follicle dynamics (Primordial, Primary, Prentral and Antral follicle stages) in all group of treatment. The ewe ovarian post-intrauterine transplantation damaged was found as follicles degeneration, ephitellial damaged and the formation of protein aggregate. It can be concluded that the histological of ewe ovarium post-intrauterine transplantation in pseudopregnancy rabbit is still good in the 5 or 7 days after intrauterine transplantation in pseudopregnancy rabbit.

Key Words: Histological, post-intrauterine transplantation, ewe ovarium

Pendahuluan

Ovarium pada hewan betina merupakan gudang dan tempat produksi oosit. Setiap ovarium mengandung oosit dalam jumlah yang sangat banyak namun hanya sedikit sekali dari jumlah oosit tersebut yang dimatangkan dan diovulasikan selama masa subur atau pada masa reproduktif (Gilbert, 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 intraspesies atau interspesies 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).

Transplantasi ovarium secara autologus pada tikus yang berumur 23 hari memperlihatkan bahwa ovarium yang berasal dari tikus yang masih belum dewasa (*immature*) yang ditransplantasikan, pada ovarium tersebut ditemukan 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).

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 di-*thawing* 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).

Teknologi reproduksi bantuan 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

*Koresponden Penulis: sumarmin68@yahoo.co.id. HP.081389958976

dapat difertilisasi. Hal ini memperlihatkan adanya keterbatasan dalam maturasi oosit secara *in vitro* (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 interspesies diharapkan akan terjadi proses pengaktifan folikel primordial, pematangan terhadap 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 interspesies lainnya dilakukan secara intrauterin oleh Kagabu dan 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.

Evaluasi terhadap histologis ovarium domba yang ditransplantasikan secara intrauterin pada kelinci pseudopregnansi perlu dilakukan sebagai dasar untuk melakukan penelitian tentang viabilitas oosit domba yang berasal dari ovarium pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji histologis ovarium domba pasca-transplantasi intrauterin pada 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.

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

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

Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan perlakuan tiga rentang waktu transplantasi yang berbeda masing-masing 5, 7 atau 9 hari. Setiap kelompok perlakuan dilakukan dengan ulangan sebanyak 6 kali.

Materi Percobaan dan Tata Kerja

Ovarium Domba

Ovarium domba dikoleksi dari Rumah Potong Hewan (RPH) pada pagi hari pukul (06.00 – 07.00 WIB). Sampel ovarium ditempatkan dalam kantong plastik yang telah diisi dengan larutan garam fisiologis 0,9% dan antibiotik penisilin G dan diletakkan dalam termos yang telah berisi es batu. Segera setelah sampai di laboratorium sampel ovarium domba dibersihkan dari jaringan lain yang terikut pada saat sampling.

Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24 ekor kelinci betina jenis New Zealand White yang telah dewasa kelamin dengan berat badan 2,5 – 3 Kg. Untuk mendapatkan kelinci betina bunting semu hari pertama, pada kelinci betina dilakukan ulas vagina (kopulasi tiruan) pada pukul enam pagi dan empat jam setelah kopulasi tiruan, kelinci dapat dijadikan sebagai resipien.

Pakan berupa butiran (pellet) dengan komposisi kandungan sebagaimana termuat dalam lampiran 1. Pakan diberikan sebanyak 100 gram/ekor/hari dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

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.

Penyediaan Ovarium Domba untuk Donor

Ovarium domba dikoleksi dari RPH Ciampea ditempatkan dalam plastik yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi antibiotik penisilin G 100 IU/ml, kemudian diletakkan dalam wadah termos yang telah diisi dengan es batu. Setelah sampai di laboratorium ovarium domba dibersihkan dari jaringan lain yang menyertainya pada saat sampling dengan menggunakan gunting dan pinset. Hal ini dilakukan dalam larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi antibiotik penisilin G 100 IU/ml di dalam *petridish* berdiameter 10 cm. Ovarium yang telah dibersihkan kemudian dibelah menjadi empat bagian dan sementara potongan jaringan ovarium tersebut ditempatkan dalam *petridish* berpenutup yang berisi larutan garam fisiologis 0,9% yang dilengkapi antibiotik penisilin G 100 IU/ml. Potongan jaringan ovarium siap untuk ditransplantasikan.

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 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. Sesudah proses penjahitan luka selesai, kemudian di atas jahitan tersebut dioleskan betadine dan kelinci dipindahkan kembali ke kandangnya menjelang siuman. Kelinci resipien kemudian dipelihara kembali dan diperhatikan proses penyembuhan lukanya setiap hari. Agar tidak terjadi infeksi dilakukan pengolesan betadine setiap pagi dan sore hari sampai luka benar-benar sembuh. Pengolesan betadine dilakukan setiap pagi dan sore hari sampai luka benar – benar sembuh agar tidak terjadi infeksi.

Pembuatan Preparat Histologis ovarium domba pascatransplantasi

Ovarium domba pascatransplantasi yang dikoleksi kembali pada hari ke 5, 7 atau 9 kemudian difiksasi dalam larutan Bouin selama 24 jam. Untuk pengerjaan pembuatan preparat selanjutnya dilakukan sesuai dengan Metode Parafin dan pewarnaan Hematoksilin-Eosin (Kiernan, 1990).

Pengamatan Variabel Percobaan

Pengamatan terhadap perubahan histologis dari ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci dilakukan dengan membandingkan histologis ovarium domba pascatransplantasi dengan histologis ovarium domba kelompok kontrol.

Analisis Data

Data yang didapatkan pada penelitian ini selanjutnya dideskripsikan dengan acuan buku Basic Histology (Junqueira dan Corneiro, 1986).

Hasil dan Pembahasan

Setelah dilakukan percobaan didapatkan hasil pengamatan seperti yang terdapat pada gambar-gambar berikut.

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa pada semua preparat baik preparat ovarium kontrol maupun preparat ovarium domba pascatransplantasi dapat ditemukan folikel primordia dan folikel primer. Namun demikian struktur jaringan ovarium domba kontrol pada bagian korteks terlihat lebih teratur jika dibandingkan struktur korteks pada jaringan ovarium pascatransplantasi. Beberapa kerusakan jaringan yang umum ditemukan pada kelompok perlakuan adalah terjadinya kerusakan lapisan epitel ovarium, hubungan antar sel pada bagian korteks dan medula ovarium yang mulai berdegenerasi sehingga jarak antar sel semakin lebar (c) dan terjadinya agregat protein pada bagian korteks sebagai hasil berdegenerasinya sel-sel folikel dan jaringan ikat. Hal yang sama ditemukan pada penelitian Cushman *et al.* (2002) yang melakukan transplantasi bagian korteks ovarium sapi pada membran embrionik ayam.

Berdasarkan hasil tersebut juga dapat diketahui bahwa kerusakan jaringan korteks terparah ditemukan pada perlakuan ovarium domba pascatransplantasi 9 hari. Kerusakan jaringan ovarium pascatransplantasi pada perlakuan 5 atau 7 hari relatif sama yaitu pada struktur korteks dari kedua perlakuan tersebut ditemukan jaringan epitel yang rusak dan terbentuknya rongga antar sel pada jaringan ikat.

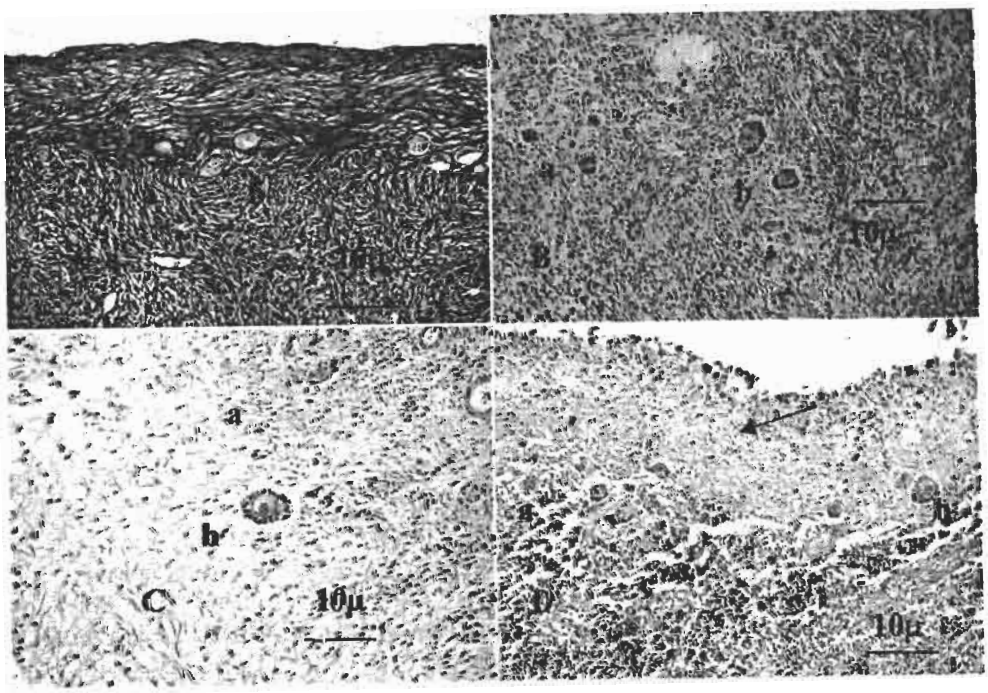
Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa pada kontrol dan kelompok perlakuan ditemukan adanya folikel preantral dengan keadaan zona Pellusida yang baik serta memiliki struktur inti yang jelas. Struktur folikel preantral perlakuan 5 hari pascatransplantasi adalah struktur folikel yang paling mirip dengan struktur folikel preantral kelompok kontrol dimana zona Pelusida dan inti sel oosit serta susunan sel-sel pengiring (sel granulosa, teca interna dan teca eksterna) dengan mudah dan jelas dapat diamati. Pada kelompok perlakuan 7 atau 9 hari pascatransplantasi meskipun zona Pelusida dan inti

sel oosit dapat dengan mudah teramati namun untuk struktur sel pengiring keadaanya tidak seteratur pada perlakuan 5 hari pascatransplantasi dan kontrol. Sel-sel pengiring mulai terlihat berdegenerasi dan membentuk rongga antar sel. Folikel preantral inilah yang nantinya berpotensi untuk dimatangkan (*maturation*) dan difertilisasi secara *in vitro* (Vasena *et al.*, 2003).

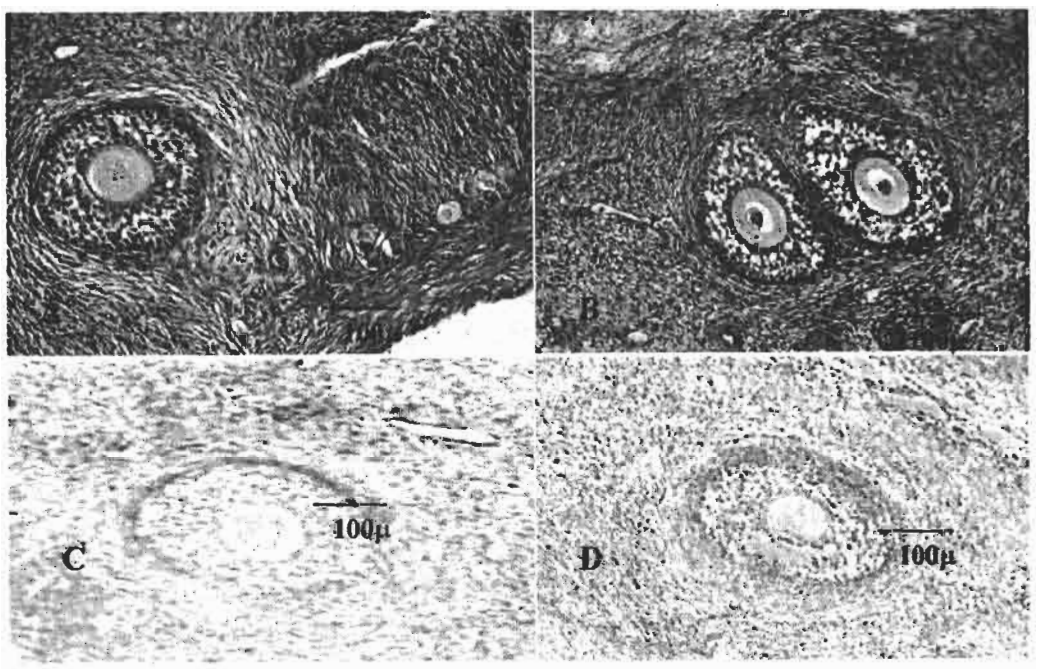
Gambar 3 dapat dilihat bahwa pada semua kelompok perlakuan ditemukan folikel antral meskipun tidak memiliki kemiripan struktur folikel yang sama. Perbedaan struktur folikel antral yang sangat menyolok terutama ditemukan pada kelompok perlakuan pascatransplantasi 9 hari. Perbedaan yang ditemukan pada folikel antral dari perlakuan 9 hari yaitu ukuran folikel yang relatif kecil meskipun dengan sel oosit yang berukuran relatif sama dengan kontrol dan perlakuan lainnya. Disamping perbedaan tersebut, hal lain yang juga bisa dilihat adalah struktur sel pengiring oosit yang membangun antrum tidak teratur dan sukar untuk ditentukan bagian sel-sel granulosa, teca interna dan teca eksterna. Kemungkinan pada sel pengiring tersebut sedang terjadi degenerasi sel atau autolisis sebagai akibat lamanya transplantasi.

Jika peristiwa autolisis terjadi lebih cepat maka sebagian sel-sel folikel berdegenerasi dan menyisakan agregat protein (Gambar 4). Agregat protein ini tidak hanya berasal dari sel-sel folikel yang berdegenerasi tetapi juga berasal dari degenerasi jaringan ikat yang terdapat pada bagian korteks ovarium. Kemungkinan peristiwa berdegenerasinya sel-sel atau jaringan tersebut disebabkan oleh tidak cukupnya ketersediaan sumber nutrisi atau energi untuk tetap mendukung proses metabolisme sel secara sempurna (Tilly, 1998). Sumber energi yang ada berupa sekreta uterus sedianya ditujukan sebagai sumber nutrisi di awal perkembangan embrio menjelang implantasi.

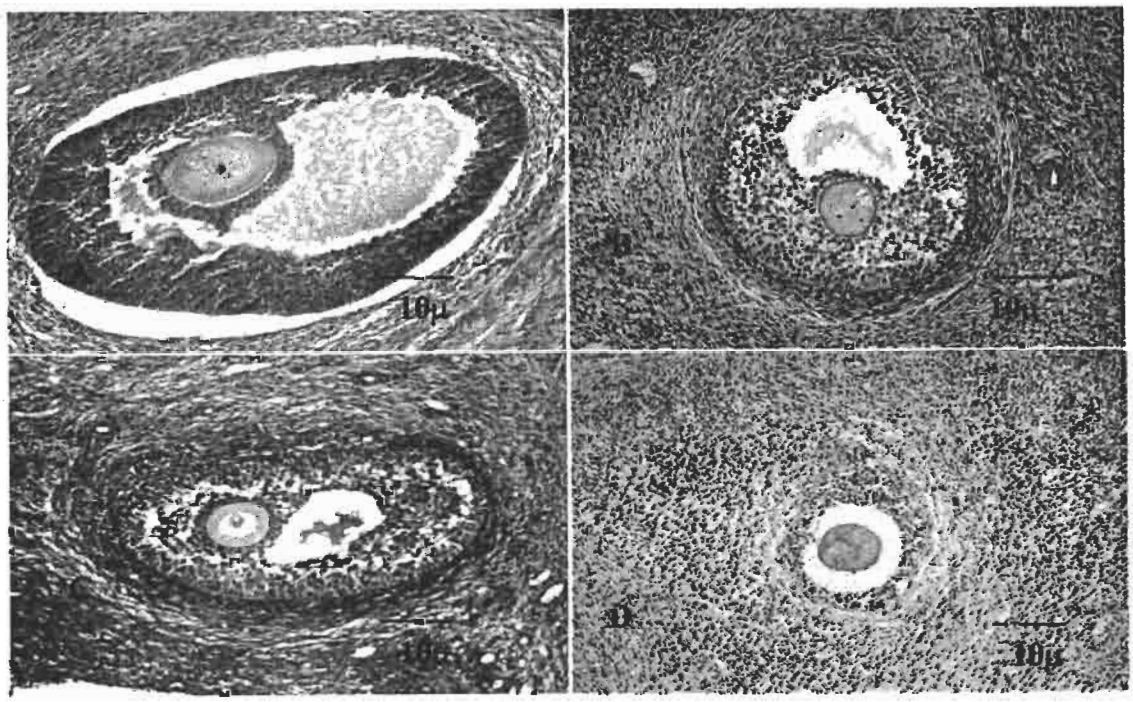
Kerusakan struktur ovarium yang terjadi sejalan dengan lamanya transplantasi dilakukan, juga ditemukan kerusakan struktur dari Korpus Luteum. Jika dibandingkan dengan kontrol, struktur korpus Luteum pada semua perlakuan terlihat berdegenerasi dan semakin tinggi tingkat degenerasi sel pada perlakuan 9 hari pascatransplantasi. Hal ini ditandai dengan ditemukan rongga antar sel yang semakin besar dan juga sel-sel korpus Luteum yang mulai berdegenerasi dan membentuk agregat protein (Gambar 5). Pada kerusakan yang lebih parah terjadi pemisahan korpus Luteum.



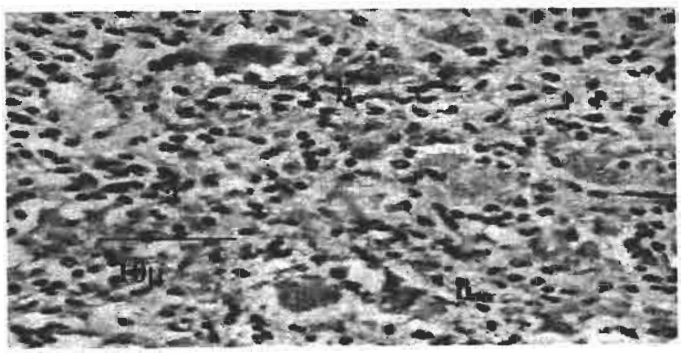
Gambar 1. Gambaran histologis bagian korteks dari ovarium.
A. Histologis Ovarium Kontrol.
B. Histologis ovarium pascatransplantasi 5 hari. C. Histologis ovarium pascatransplantasi 7 hari.
D. Histologis ovarium pascatransplantasi 9 hari. a Folikel primordial. b Folikel primer. c Rongga antar sel



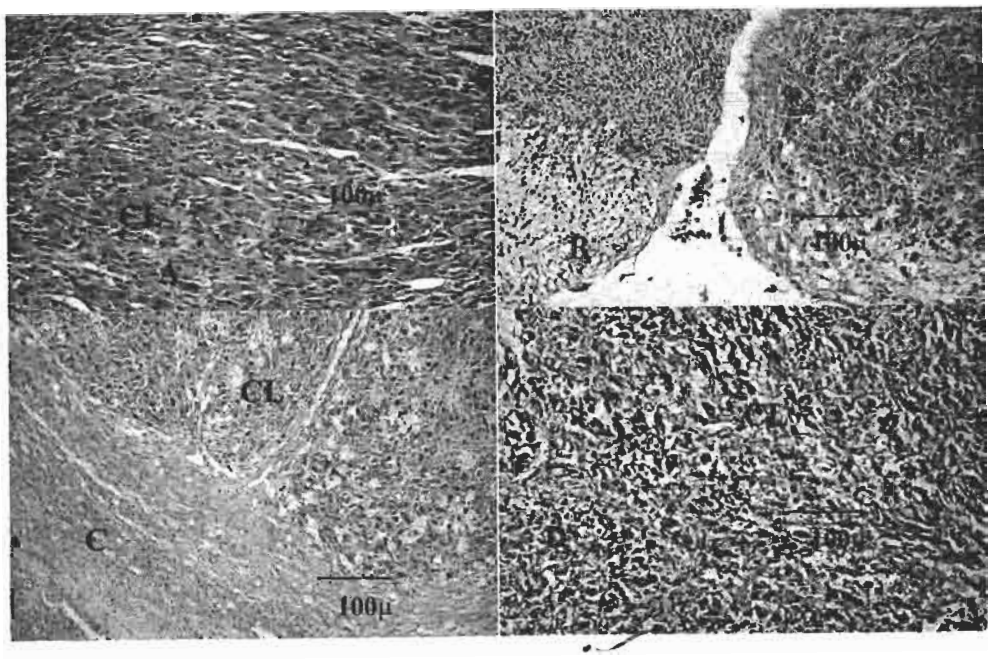
Gambar 2. Gambaran histologis tingkat perkembangan folikel sekunder ovarium domba.
A. Histologis ovarium kelompok kontrol. B. Histologis ovarium kelompok pascatransplantasi 5 hari.
C Histologis ovarium kelompok pascatransplantasi 7 hari. D. Histologis ovarium pascatransplan-tasi 9 hari.



Gambar 3. Gambaran histologis folikel antral pada berbagai perlakuan.
A Histologis ovarium kontrol.
B Histologis ovarium pascatransplantasi 5 hari. C Histologis ovarium pascatransplantasi 7 hari.
D Histologis ovarium pascatransplantasi 9 hari.



Gambar 4. Gambaran histologis terjadinya degenerasi sel (a) dan pembentukkan agregat protein (b).



Gambar 5. Gambaran histologis jaringan Corpus Luteum.
A Histologis ovarium kelompok kontrol
B Corpus Luteum pascatransplantasi 5 hari. C Corpus Luteum pascatransplantasi 7 hari
D Corpus Luteum pascatransplantasi 9 hari

Korpus Luteum yang berdegenerasi ini diduga karena peristiwa autolisis dan juga saat terpisah dari domba donor maka fungsi korpus Luteum tidak bisa dipertahankan karena tidak adanya faktor luteotropik yang mendukungnya, sedangkan media nutrisi yang berasal dari sekreta uterus kelinci kemungkinan tidak mampu mendukung kebutuhan energi atau nutrisi untuk metabolisme sel-sel korpus Luteum (Tilly, 1996;1998). Hal inilah yang menyebabkan korpus Luteum menjadi berdegenerasi.

Kesimpulan

Dari hasil dan pembahasan tentang histologis jaringan ovarium domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi dapat diambil kesimpulan bahwa masih dapat ditemukan folikel primordial, folikel primer, folikel preantral dan antral pada semua perlakuan. Kerusakan jaringan yang ditemukan yaitu kerusakan jaringan epitel, degenerasi sel folikel dan jaringan ikat serta ukuran folikel yang tidak sejalan dengan perkembangannya terutama ditemukan pada perlakuan 9 hari pascatransplantasi.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kualitas oosit yang ditemukan sampai hari ke 7 pascatransplantasi untuk mengetahui viabilitas oosit domba pascatransplantasi intrauterin pada kelinci pseudopregnansi serta kemampuannya untuk berkembang setelah IVF.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DP3M DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui dana Hibah Tim Pascasarjana tahun 2005-2007.

Daftar Pustaka

Colby, E.D., 1986. The Rabbit dalam *Current Theraphy in Theriogenology 2*. Morrow DA. Editor. WB Sounders Co. Philadelphia.

Cushman, R.A., C.M. Wahl, and J.E. Fortune, 2002. Bovine ovarian cortical pieces grafted to chick embryonic membranes : a model for studies on the activation of primordial follicles. *Human Reproduction* 17(1): 48 – 54.

Dissen, G.A., H.E. Lara, W.H. Fahrenbach, M.A. Costa and S.R. Ojeda, 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 M. Lopez, 2000. Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbit. *Animal Reproduction Science* 64: 121 – 126.

Gilbert F. Scott, 1994. Developmental Biology. 4th edition. Sinauer Association, Inc. Sunderland, Massachusetts. P. 803-805.

Gosden, R.G., M.I. Boulton, K. Grant, and R. Webb, 1994a. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. Reproduction Fertility 101: 619 – 623.

Gosden, R.G., D.T. Baird, J.C. Wade, and R. Webb, 1994b. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovaries autografts stored at -196 degrees C. *Human Reproduction* 9(4): 597 – 603.

Gunasena, K.T., J.R. Lakey, P.M. Vilines, E.S. Critser, and J.K. Critser, 1997. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biology Reproduction* 57(2): 226 – 231.

Gunasena, K.T., J.R. Lakey, P.M. Vilines, M. Bush, C. Raath, E.S. Critser, L.E. Mc Gann, and J.K. Critse, 1998. Antral follicles develot inxenografted cryopreserved African elephant (Loxodonta africana) ovarian tissue. Animal Reprod Science 53: 265 – 175.

Hafez, E.S.E., 1970. Reproduction and Breeding techniques for Laboratory Animal. Lea and Febiger. Philadelphia.

Junqueira, L.C., and J. Corneiro, 1986. Histologi Dasar. Edisi 2. Penterjemah Adji Dharma.EGC Press. Jakarta.

Kagabu, S., and M. Umezu, 2001. Effect of blood transfusion on the survival rate of cryopreserved mouse ovaries transplanted into rat uterine cavity. *Mammakan Ovarium Research* 18: 58 – 61.

Kiernan, J.A., 1990. Histological and Histochemical Methods. 2nd edition. Pergamon Press. Oxford.

Kim, S.S., J. Radford, M. Harris, J. Varley, A. Rutherford, B. Lieberman, S. Shalet, and R.Gosden, 2001. Ovarian tissue harvested from lymphoma patients to preserve fertility may be save for autotransplantation. *Biology Reproduction* 16(10): 2056 – 2060.

Liu, J., E.J. Van der, B.R. Van den, F. Dumortier, and M. Dhont, 2000. Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. *Biology Reproduction* 62: 1218 – 1223.

Liu, J., E.J. Van der, B.R. Van den, and M. Dhont, 2002. Early massive follicle loss and apoptosis in heterotropically grafted newborn mouse ovaries. *Human Reproduction* 17(3): 605 – 611.

Parkening, T.A., T.J. Collins, and F.F.B. Elder, 1985. Orthotopic ovarian transplantations in young and aged C57BL/6J mice. *Biology Reproduction* 32: 989 – 997.

Snow, M., S.L. Cox, G. Jenkin, A. Trounson, and J. Shaw, 2002. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* 297: 2227.

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie, 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistik*. Penterjemah Soemantri. Gramedia. Jakarta.

Techakumphu, M., S. Wintenberger-Torres, and C. Sevellec, 1987. Survival of rabbit embryos after synchronous or asynchronous transfer. *Animal Reproduction Science* 12: 297 – 304.

Tilly J., 1996. Apoptosis and ovarian function. *Reproduction* 1: 162-172.

Tilly J., 1998. Cell death and species propagation: molecular and genetic aspects of apoptosis in the vertebrate female gonad, in: *When Cells Die*. Edited by Lokhsin *et al*. Willey-Liss. Toronto.

Vasena R, R.J. Mapletoft, S. Allodi, J. Singh, and G.P. Adam, 2003. Morphology and development competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* 60: 923-932.