

**PERBANDINGAN FRAGMENTASI DNA FOLIKEL PRIMER
JARINGAN KORTEKS OVARIUM *FRESH* NON TRANSPLAN,
FRESH TRANSPLAN, VITRIFIKASI NON TRANSPLAN DAN
VITRIFIKASI TRANSPLAN PADA MODEL BINATANG**

**COMPARISON OF PRIMARY FOLLICLE DNA FRAGMENTATION
OF OVARIAL CORTEX TISSUE *FRESH* NON TRANSPLAN, *FRESH*
TRANSPLAN, VITRIFICATION NON TRANSPLAN AND
VITRIFICATION TRANSPLAN IN ANIMAL MODELS**

Edy Priyanto¹, Shofwal Widad², Agung Dewanto²

¹Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal
Soedirman

²Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan
Keperawatan Universitas Gadjah Mada/RSUP dr.Sardjito Yogyakarta

ABSTRAK

Latar Belakang : Kriopreservasi jaringan ovarium merupakan salah satu pendekatan cara mempertahankan fertilitas pada wanita yang diprediksi mengalami kegagalan ovarium prematur sebagai konsekuensi dari kemoterapi, radioterapi atau kelainan genetik. Kriopreservasi dengan vitrifikasi menjadi fokus investigasi meskipun masih terdapat kontroversi terhadap hasil akhirnya, karena belum ada protokol optimal untuk vitrifikasi serta data vitrifikasi jaringan ovarium manusia masih terbatas dan berlainan hasil. Tujuan dari penelitian ini untuk mengevaluasi metode vitrifikasi modifikasi Suzuki pada folikel primer jaringan korteks ovarium

Metode : Penelitian ini menggunakan uji eksperimental jenis *one shot case study* dengan menggunakan 28 jaringan korteks ovarium kambing (*Capra aegagrus hircus*) yang terbagi dalam 4 perlakuan yaitu jaringan korteks ovarium *fresh* non transplan, jaringan *fresh* ditransplantasikan ke CAM (*chorioallantoic membrane*) ayam, jaringan di vitrifikasi non transplan dan jaringan di vitrifikasi yang ditransplantasikan ke CAM. Penilaian fragmentasi DNA folikel primer pada setiap grup dilakukan dengan metode TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) yang dilakukan di laboratorium fisiologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Analisis statistik data penelitian dilakukan dengan uji ANOVA.

Hasil : Fragmentasi DNA pada folikel primer grup *fresh* non transplan : 17,39 %, *fresh* transplan : 12,5 %, vitrifikasi non transplan : 17,39 % dan vitrifikasi transplan 7,4 %. Uji komparasi 4 grup didapatkan $p = 0.782$ ($p < 0.05$).

Simpulan : Tidak terdapat perbedaan signifikan fragmentasi DNA folikel primer jaringan korteks ovarium antara fresh non transplan, fresh transplan, vitrifikasi non transplan dan vitrifikasi transplan yang menunjukkan metode vitrifikasi modifikasi Suzuki dapat mempertahankan folikel dari fragmentasi DNA.

Kata Kunci : Kriopreservasi, vitrifikasi, fragmentasi DNA, TUNEL

ABSTRACT

Background : Ovarian tissue cryopreservation is one approach to maintaining fertility in women who are predicted to experience premature ovarian failure as a consequence of chemotherapy, radiotherapy or genetic disorders. Vitrified cryopreservation is the focus of investigations although there is still controversy over the final results, because there is no optimal protocol for vitrification and human ovarian tissue vitrification data is still limited and different. The purpose of this research is for evaluating the Suzuki modification vitrification method on primary follicles of ovarian cortex tissue

Method : This research is an experimental test type of one shot case study using 28 goat ovarian cortex tissues (*Capra aegagrus hircus*) which are divided into 4 treatments, namely fresh non-transplanted ovarian cortex tissue, fresh tissue transplanted into chicken CAM (chorioallantoic membrane), tissue in non-transplanted vitrification and vitrified tissue transplanted into CAM. Assessment of primary follicular DNA fragmentation in each group was carried out using the TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) method conducted at the physiology laboratory of the Faculty of Medicine, Public Health and Nursing, University of Gadjah Mada Yogyakarta. Statistical analysis of research data was carried out with the ANOVA test.

Conclusion : There were no significant differences in DNA fragmentation of primary follicles of ovarian cortex tissue between fresh non-transplanted, fresh transplanted, non-transplanted vitrification and transplant vitrification which showed that Suzuki's modified vitrification method can defend follicles from DNA fragmentation.

Keywords : Cryopreservation, vitrification, DNA fragmentation, TUNEL

PENDAHULUAN

Beberapa tahun terakhir, permintaan preservasi fertilitas karena alasan onkologi dan non-onkologi serta alasan pribadi meningkat secara dramatis, dan untuk memenuhi permintaan ini akan menjadi tantangan besar di tahun-tahun mendatang. Saat ini, kriopreservasi embrio dan kriopreservasi oosit setelah stimulasi ovarium adalah satu-satunya metode preservasi kesuburan yang didukung oleh *American Society for Reproductive Medicine*. Namun, banyak ahli percaya bahwa sekarang ada cukup bukti untuk mendukung penggunaan kriopreservasi jaringan ovarium sebagai terapi yang valid dan teknik yang efektif bukan hanya sebagai eksperimen saja (Donnez dan Dolmans, 2017).

Kriopreservasi jaringan ovarium manusia merupakan salah satu pendekatan cara mempertahankan fertilitas pada wanita yang diprediksi mengalami kegagalan ovarium prematur sebagai konsekuensi dari kemoterapi, radioterapi atau kelainan genetik.

perbandingan fragmentasi dna folikel primer jaringan korteks ovarium *fresh* non transplan, *fresh* transplan, vitrifikasi non transplan dan vitrifikasi transplan pada model binatang (edy priyanto)

Kriopreservasi merupakan pilihan yang paling baik untuk usia prapubertas dan bagi banyak wanita muda untuk menyimpan oosit. Sampai saat ini, autotransplantasi jaringan korteks ovarium yang dibekukan dan kemudian di-*thawing* telah menghasilkan kelahiran 24 anak-anak yang sehat di seluruh dunia (Sheiki, 2013). Kriopreservasi oosit manusia dan embrio atau blastokis merupakan pilihan penting dalam teknik reproduksi berbantu. Ini memberi kesempatan bagi pasien untuk memiliki lebih dari satu kesempatan dengan hanya sekali stimulasi ovarium, sehingga mengurangi paparan pasien terhadap gonadotropin eksogen (Tavukcuoglu *et al*, 2012).

Kriopreservasi dan transplantasi jaringan ovarium masih merupakan prosedur eksperimental untuk preservasi fertilitas pada wanita yang mengalami kegagalan fungsi reproduksi. Teknik ini memungkinkan sebagai alternatif terapi medis untuk mengobati gangguan medis utama akibat obat gonadotoxic. Jaringan ovarium dapat diambil dengan laparoskopi atau laparotomi dengan melakukan beberapa biopsi ovarium, atau ooforektomi parsial, uni atau bilateral dan kemudian dilakukan vitrifikasi. Jaringan ovarium yang divitrifikasi selanjutnya dilakukan autotransplantasi setelah selesainya terapi medis dengan obat gonadotoxic. Selain itu dapat berfungsi juga sebagai sumber folikel untuk IVM/ *in vitro maturation* (Amorim *et al*, 2012). Autotransplantasi akan bermanfaat terutama pada pasien yang berurusan dengan perawatan imunosupresan. Pilihan yang paling menguntungkan adalah autotransplantasi ortotopik karena menyerupai pada konsepsi alami, sementara transplantasi heterotopik adalah alternatif autotransplantasi lain. Baik allotransplantation (spesies yang sama) maupun xenografting pada hewan dari spesies yang berbeda juga menyediakan opsi dan perawatan lebih lanjut.

Vitrifikasi adalah teknik yang cepat dan sederhana yang menunjukkan prospek nyata untuk kriopreservasi jaringan biologis heterogen seperti korteks ovarium. Untuk meminimalkan toksisitas krioprotektan tanpa mempengaruhi sifat vitrifikasi, konsentrasinya yang relatif rendah dari krioprotektan yang berbeda dapat dikombinasikan.

Protokol vitrifikasi tidak meningkatkan persentase folikel dan sel stroma pada fragmentasi DNA setelah *warming*. Dengan demikian vitrifikasi korteks ovarium tidak didapatkan kerusakan DNA ireversibel yang mungkin timbul akibat apoptosis dan / atau aktivasi stres oksidatif (Sanfilippo *et al*, 2015). Namun dalam sebuah penelitian sebelumnya, Xiao *et al*, melaporkan peningkatan yang signifikan dalam fragmen DNA TUNEL yang dinilai pada folikel manusia dan sel stroma setelah vitrifikasi dengan kontak langsung korteks ovarium dengan nitrogen cair.

Penelitian ini mengamati protokol vitrifikasi modifikasi dari Suzuki pada folikel primer.

SUBYEK DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan ovarium dari kambing yang didapatkan *fresh* dari tempat pemotongan hewan (RPH) ditempatkan dalam botol transport dengan menggunakan medium M199, FBS. Untuk menjaga kualitas ovarium agar tetap baik setelah proses pemotongan hewan menuju laboratorium dilakukan dengan cara menempatkan ovarium pada kondisi lingkungan yang tepat (Silva *et al*, 2014). Waktu, suhu dan medium yang digunakan merupakan beberapa faktor yang berpengaruh terhadap kondisi ovarium selama penyimpanan. (Santos *et al*, 2002; Tulake *et al*, 2014; Febretrisiana *et al*, 2015). Titik kritis yang perlu perhatian khusus adalah periode dari saat pemotongan ternak dengan saat ovarium diproses untuk koleksi oosit. Rentang waktu ini

merupakan penentu kualitas ovarium dan oosit yang akan diperoleh. Medium untuk penyimpanan ovarium selama transportasi diupayakan pada suhu yang optimal untuk ovarium baik dalam keadaan dingin (4°C) (Febresitrisiana dan Pamungkas, 2017). Kemudian jaringan ovarium bagian korteks dipotong dengan ukuran $1 \times 1 \times 0,1 \text{ cm}^3$ dengan menggunakan *tissue slicer*.

Jaringan kemudian di bagi menjadi 4 kelompok dengan perlakuan berbeda antara lain vitrifikasi non transplan, vitrifikasi transplan, fresh non transplan, fresh transplan. Pada perlakuan *unfrozen*/fresh non transplan potongan jaringan ovarium langsung difiksasi dalam 4% paraformaldehid (PFA 4%) dan dilakukan pemeriksaan histologi. Pada perlakuan vitrifikasi potongan jaringan ovarium dilakukan protocol vitrifikasi menggunakan resep vitrifikasi modifikasi Suzuki *et al* (2015).

Resep vitrifikasi menurut Suzuki *et al* (2015) telah dimodifikasi dari medium dan serumnya. Dimana TCM199 diganti dengan M199 dan SSS diganti dengan FBS. Menjadi sebagai berikut:

1. Medium (M199)+ 20% serum (FBS) + ethylon glikol 10% $\rightarrow$ 5 menit
2. Medium (M199)+ 20% serum (FBS)+ ethylon glikol 20% $\rightarrow$ 5menit
3. Medium (M199)+ 20%serum (FBS) +35% ethylon glikol +5% PVP+0,5 mol/L sukrosa $\rightarrow$ 15 menit

Resep thawing Suzuki *et al* (2015) dengan modifikasi :

1. medium+20% serum+0,8M sukrosa 1 menit
2. medium+20%serum+ 0,4 M sukrosa (3 menit)
3. medium +20% serum (5 menit)
4. medium +20% serum (5 menit)

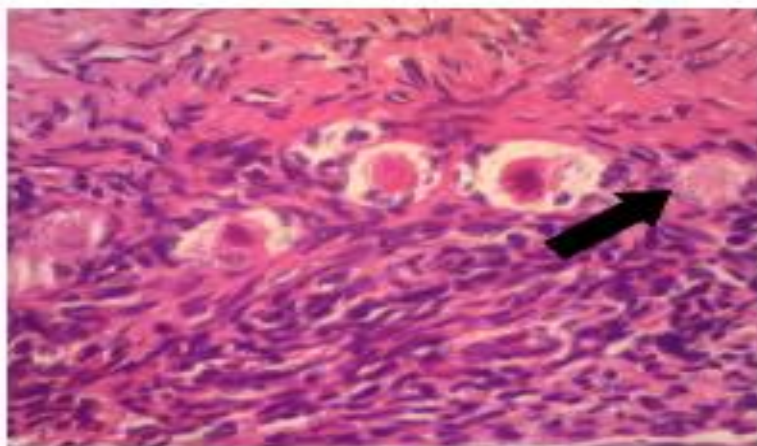
Setelah satu hari dalam kondisi beku potongan jaringan dilakukan protocol *thawing* sesuai resep Suzuki *et al* (2015). Setelah melalui prosedur vitrifikasi dan thawing, jaringan diperkecil ukurannya menjadi $0,5 \times 0,5 \times 0,1 \text{ cm}^3$. Jaringan korteks ovarium pasca vitrifikasi-*thawing* ditanam pada *chorioallantoic membrane* (CAM) telur ayam berusia 5-10 hari selama 5 hari pada suhu $37\text{-}38^{\circ}\text{C}$ dan kelembaban 44%. Jaringan kemudian dipanen difiksasi dalam 4% paraformaldehid dan dibuat sediaan histologis serta dilakukan pemeriksaan histologi. Adapun pemeriksaan histologi yang dilakukan pada keempat perlakuan adalah DNA fragmentasi menggunakan TUNEL dengan kontrol positif uji optimasi DNase.

Pemeriksaan DNA fragmentasi menggunakan pemeriksaan TUNEL pada keempat kelompok perlakuan. Folikel dikategorikan atretic jika ditemui $\geq 49\%$ dari GC dan oosit positif TUNEL. Data berupa persentase folikel primer atretic dari tiap potongan ovarium *unfrozen* dan vitrifikasi kemudian dianalisis secara statistik.

Metode penelitian ini menggunakan uji eksperimental jenis *one shot case study* dengan menggunakan 28 jaringan korteks ovarium kambing (*Capra aegagrus hircus*) yang terbagi dalam 4 perlakuan yaitu jaringan korteks ovarium *fresh* non transplan, jaringan *fresh* ditransplantasikan ke CAM (*chorioallantoic membrane*) ayam, jaringan di vitrifikasi non transplan dan jaringan di vitrifikasi yang ditransplantasikan ke CAM. Penilaian fragmentasi DNA folikel primer pada setiap grup dilakukan dengan metode TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) yang dilakukan di laboratorium fisiologi Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Analisis statistik data penelitian dilakukan dengan uji ANOVA.

HASIL PENELITIAN

Dari semua sampel terdapat folikel yang tampak setelah pengecatan HE (hematoksilin-eosin), seperti terlihat dalam gambar berikut ini :



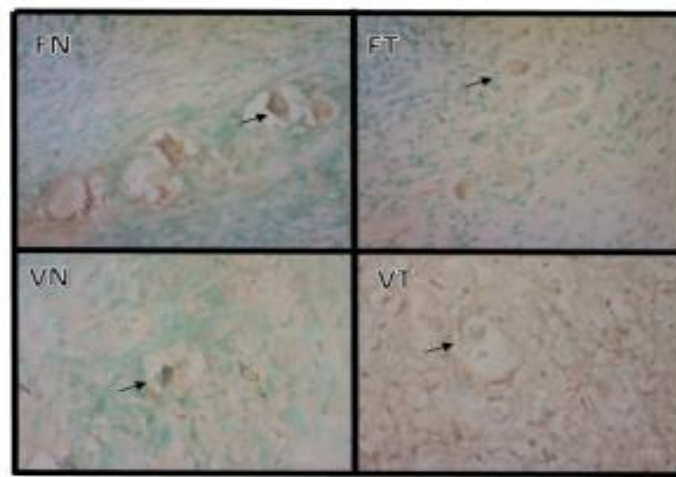
Gambar 1. Gambaran folikel dengan pewarnaan HE

Tampak gambaran folikel primer (anak panah) adalah folikel ovarium yang belum matang, yang dikelilingi oleh satu atau beberapa lapisan sel granulosa kuboid.

Tabel 1. Data deskripsi histologi

Grup	Folikel Primordial	Folikel Primer	Folikel Sekunder	Total
Fresh non transplan (FN)	110	46	2	158
Fresh transplan (FT)	105	16	0	121
Vitrifikasi non transplan (VN)	63	23	0	86
Vitrifikasi transplan (VT)	68	27	2	75

Dari tabel di atas didapatkan jumlah folikel primordial dominan pada setiap grup, sedang fokus penelitian ini adalah folikel primer dimana peran FSH sudah terjadi pada tahap ini. Grup FN sebanyak 29,1 % dari total folikel pada grup FN, grup FT 13,2 %, grup VN 26,7 % dan grup VT 36 %.

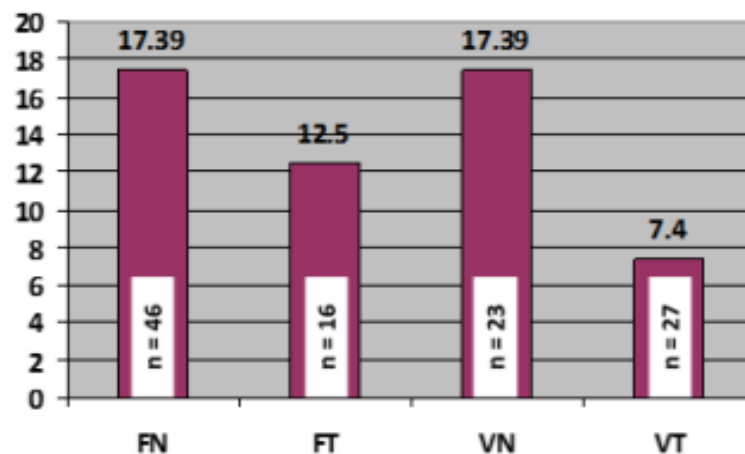


Gambar 2. Gambar folikel primer terfragmentasi (anak panah)

Tabel 2. Data folikel primer terfragmentasi

Grup	Folikel Primer	
	Jumlah	Positif (%)
Fresh non transplan (FN)	46	17,39
Fresh transplan (FT)	16	12,5
Vitrifikasi non transplan (VN)	23	17,39
Vitrifikasi transplan (VT)	27	7,4

Pada folikel primer terfragmentasi didapatkan angka terendah pada kelompok vitrifikasi transplan (7,4 %) dan pada kelompok non transplan mendapatkan hasil yang sama (17,39 %).



Grafik 1. Rerata Jumlah Folikel Primer Terfragmentasi

Uji normalitas dan varians data menunjukkan semua grup mempunyai data yang normal dan sama, $p=0,260$ ($p>0,05$). Dari uji ANOVA komparasi 4 grup folikel primordial terfragmentasi didapatkan $p = 0.782$ ($p<0.05$) yang berarti tidak terdapat perbedaan fragmentasi DNA folikel primordial antara *fresh* non transplan, *fresh* transplan, vitrifikasi non transplan dan vitrifikasi transplan pada model binatang.

PEMBAHASAN

Kriopreservasi oosit dari folikel pra-antral telah dipelajari selama dekade terakhir. Prosedur dapat dibagi antara kriopreservasi jaringan ovarium atau folikel yang terisolasi. Sebagian besar penelitian menggambarkan protokol pembekuan lambat/pencairan cepat untuk fragmen ovarium cryopreserve. Gambaran histologi menunjukkan bahwa folikel mempertahankan integritas morfologisnya, dan transplantasi jaringan ovarium menunjukkan bahwa folikel dapat memulai kembali pertumbuhannya dan akhirnya berovulasi. Beberapa kelompok penelitian telah memperoleh keturunan menggunakan prosedur ini pada tikus dan domba. Berkenaan dengan kriopreservasi folikel terisolasi, beberapa penelitian yang dilaporkan di daerah ini menggunakan protokol pembekuan yang sama, dan beberapa dari mereka menggambarkan pertumbuhan folikel menggunakan kultur in-vitro. Hasil terbaik diperoleh pada tikus, dengan kelahiran hewan setelah kriopreservasi dan kultur folikel. Namun, studi tambahan diperlukan untuk pemahaman yang lebih baik tentang peristiwa selama kriopreservasi folikel dan untuk menetapkan protokol standar untuk transplantasi ovarium atau kultur folikel (Amorim *et al*, 2003).

Kriopreservasi jaringan kortikal ovarium yang mengandung folikel primordial dan primer dalam jumlah tinggi akan bermanfaat bagi wanita muda yang akan menjalani kemoterapi atau radioterapi, atau mengantisipasi kegagalan ovarium prematur. Jaringan ovarium manusia telah berhasil cryopreserved menggunakan dimetil sulfat, propanediol dan etilen glikol sebagai cryoprotectants. Pematangan oosit dalam kultur in vitro dari folikel awal akan lebih baik daripada penanaman kembali untuk anak perempuan dengan keganasan yang dapat ditanam kembali dengan jaringan. Untuk saat ini kami telah berhasil mengkultur folikel primordial dan primer manusia kriopreservasi ke sekunder, dan kadang-

kadang ke tahap antral awal dalam kultur organ dalam irisan jaringan kortikal dalam matriks ekstraseluler. Pematangan oosit dalam kultur *in vitro* dari folikel awal akan lebih baik daripada penanaman kembali untuk anak perempuan dengan keganasan yang dapat ditanam kembali dengan jaringan. Untuk saat ini kami telah berhasil mengkultur folikel primordial dan primer manusia kriopreservasi ke sekunder, dan kadang-kadang ke tahap antral awal dalam kultur organ dalam irisan jaringan kortikal dalam matriks ekstraseluler. Viabilitas setelah pencairan telah ditunjukkan secara morfologis, menggunakan tes viabilitas, dengan mentransplantasikan jaringan ke tikus immunodeficient, dan dengan mengkulturkannya secara *in vitro*. (Hovatta, 2000).

Dalam studi ini didapatkan tidak adanya perbedaan jumlah folikel dan morfologi dari sebelum dan sesudah perlakuan. Hal ini sesuai dengan penelitian Wiweko *et al* (2014) yang menyatakan tidak adanya perbedaan bermakna morfologi dari sel granulosa, stroma dan kolagen jaringan ovarium sebelum dan sesudah vitrifikasi termasuk jumlah folikel primordial, primer dan folikel atresia. Penurunan jumlah folikel berkaitan dengan usia lanjut dan distribusi folikel di korteks ovarium (Wiweko *et al*, 2014 ; Fabbri, 2006) . Jumlah folikel juga tergantung pada teknik pengambilan sampel dan pemilihan permukaan kortikal ovarium (Wang *et al*, 2009). Pada korteks ovarium yang dibekukan, jumlah dan kualitas folikel dapat diprediksi kemungkinan pengembalian fungsi reproduksi (Shi *et al*, 2017). Pada penelitian ini didapatkan nilai fragmentasi DNA pada kelompok transplan lebih rendah daripada non transplan pada folikel primordial dan primer. Hal ini menandakan kerusakan jaringan lebih sedikit pada grup transplan baik pada jaringan *fresh* maupun jaringan vitrifikasi yang mendukung sebuah hipotesis adanya fase ischemic-reperfusion yang ditandai adanya penurunan densitas vaskular secara signifikan pada jaringan simpan beku pasca transplan. Adanya regenerasi stroma jaringan pasca transplantasi yang dipicu oleh adanya kerusakan jaringan dan indikator kembalinya vaskularisasi melalui proses neovaskularisasi (Hamurajib *et al*, 2018).

Walaupun tidak berbeda bermakna, penelitian ini menunjukkan jaringan yang divitrifikasi dan di transplantasikan lebih superior dalam ketahanan terhadap kerusakan DNA menjadikan wacana baru yang dapat dikembangkan untuk penelitian yang akan datang sehingga kriopreservasi dan transplantasi jaringan ovarium dapat merupakan pilihan utama dalam preservasi fertilitas pasien kanker. Kriopreservasi dapat dilakukan dengan teknik slow freezing dan vitrifikasi, namun vitrifikasi lebih diunggulkan karena membutuhkan waktu lebih singkat dengan tingkat kerusakan folikel dan doxyribonucleic acid (DNA) yang lebih sedikit (Shi *et al*, 2017). Sedangkan transplantasi jaringan ovarium dapat dilakukan baik dengan autotransplantasi atau xenografting pada hewan (Varghese *et al*, 2008). Hasil dari penelitian ini merupakan langkah awal yang diharapkan mampu mendukung pengembangan protocol transplantasi simpan beku korteks ovarium yang mampu mencegah dari kehilangan sel folikel yang signifikan pada manusia. ada penelitian ini didapatkan nilai $p = 0,782$ pada komparasi keempat grup menandakan tidak adanya perbedaan dalam fragmentasi DNA yang terjadi, hal ini dapat menguatkan kriopreservasi dan transplantasi jaringan korteks ovarium merupakan metode yang dapat digunakan terutama untuk kasus preservasi ovarium jangka panjang sesuai dengan penelitian Ayuandari *et al* (2016) yang menyatakan berkembangnya secara signifikan folikel primordial, primer dan sekunder setelah kriopreservasi dan xenotransplantasi pada ovarium setelah 4 dan 12 minggu.

Protokol vitrifikasi yang peneliti gunakan merupakan protokol vitrifikasi modifikasi dari Suzuki, tidak didapatkan perbedaan bermakna DNA fragmentasi pada

perbandingan fragmentasi dna folikel primer jaringan korteks ovarium *fresh* non transplan, *fresh* transplan, vitrifikasi non transplan dan vitrifikasi transplan pada model binatang (edy priyanto)

folikel primer antara grup *fresh* dan vitrifikasi. Berbeda dengan penelitian oleh Xiao *et al* (2010) yang menyatakan adanya peningkatan signifikan dalam fragmentasi DNA TUNEL dinilai dalam folikel manusia dan sel stroma setelah vitrifikasi oleh kontak langsung dari korteks ovarium dengan nitrogen cair. Hal ini dimungkinkan karena protokol yang berbeda, Xiao *et al* menamai protokolnya dengan *needle immersed vitrification* (NIV) dimana ditambahkan jaringan tembaga yang dapat menurunkan kadar konsentrasi CPA.

Disisi lain yang dapat diambil dari penelitian ini, dimanfaatkan sebagai metode memperoleh bibit unggul pada hewan ternak khususnya kambing. Pemanfaatan ovarium yang berasal dari RPH sebagai bagian dari penyelamatan materi genetik dan peningkatan nilai guna ternak dapat diupayakan melalui perkembangan teknologi yang saat ini berkembang pesat. Teknologi reproduksi berbantuan seperti fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu yang dapat diaplikasikan (Rani dan Paliwal, 2014).

DAFTAR PUSTAKA

- Amorim CA, Goncalves PBD, Figueiredo JR, Cryopreservation of oocytes from pre-antral follicles, Hum Reprod Update. 2003 Mar-Apr;9(2):119-29. doi: 10.1093/humupd/dmg014.
- Amorim CA, Dolmans MM, David A, Jaeger J, Vanacker J, Camboni A, Donnes J, Langendonck AV., 2012, *Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. Fertil Steril.* 2012;98(5):1291-1298
- Ayuandari S., Wagner C., Wildt L., Crepaz KW., Zavadil C, Manzl C., Tollinger SH., Paulitsch M., Ziehr SC, 2016, *Follicular growth after xenotransplantation of cryopreserved /thawed human ovarian tissue in SCID mice: dynamics and molecular aspects*, J Assist Reprod Genet, DOI 10.1007/s10815-016-0769-2
- Donnez J., Dolmans M.M, 2017, *Fertility Preservation in Women*, NEJM 377;17
- Fabbri R., 2006, *Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. Cell Tissue Bank* 2006;7:113-22
- Febretrisiana A., Setiadi M.A., Karja N.W.K., 2015, *Nuclear maturation rate of sheep oocyte in vitro: Effect of storage duration and ovary temperature. J Indonesian Trop Anim Agric.* 40:93-99
- Hamurajib KC, Alma NA, Huda RF, Pradatama I, Husna N, Ayuandari S., Widad S., Dewanto A., 2018, *Vaskularisasi Jaringan Korteks Ovarium Kambing Setelah Vitrifikasi dan Transplantasi pada Chorioallantoic Membrane Ayam*, INAJOG, volum 6 suplement 1. July 2018
- Hovatta O, Cryopreservation and culture of human primordial and primary ovarian follicles, Molecular and Cellular Endocrinology, Volume 169, Issues 1–2, 27 November 2000, Pages 95-97
- Rani K, Paliwal S. 2014. *A brief review on in vitro fertilization (IVF) : An advanced and miraculous gateway for infertility treatments. World J Pharm Sci.* 3:647-658
- Sanfilippo S., Canis M., Smitz J., Sion B., Darcha C., Janny L., Brugnon F., 2015, *Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing, Reproductive Biology and Endocrinology* (2015) 13:67
- Santos R.R., Silva J.R.V., Costa S.H., Rodrigues A.P.R., Lobo R.N.B., Figueiredo J.R., 2002. *Effect of 0.9% saline solution and phosphate buffer saline at different*

- temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. *Braz J vet Res anim Sci.* 39:254-259
- Sheikhi M., 2013, *Clinical Grade Vitrification of Human Ovarian Tissue for Fertility Preservation*, Karolinska Institutet, Stockholm 2013
- Shi Q., Xie Y., Wang Y., Li S., 2017, *Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-anlaysis*, *Scientific Reports* 7, Article number: 8538 (2017)
- Silva A, Lima G, Peixoto GCX, Caetano de Souza AC, 2015, Cryopreservation in mammalian conservation biology: current applications and potential utility, *Research and Reports in Biodiversity Studies*, DOI : 10.2147/RRBS.S54294
- Suzuki N., Yoshioka N, Takae S., Sugishita Y., Tamura M, Hashimoto S., Morimoto Y, Kawamura K., 2015, *Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency*, *Hum. Reprod.*, Vol.30, No.3 pp. 608–615, 2015
- Tavukcuoglu S., Al-Azawi T., Khaki A.A., Al-Hasani S., 2012, *Is vitrification standard method of cryopreservation*, *Middle East Fertility Society Journal* (2012) 17, 152–156
- Tulake K., Yanagawa Y., Takahashi Y., Katagiri S., Higaki S., Koyama K., Wang X., Li H., 2014. *Effects of ovarian storage condition on in vitro maturation of Hokkaido Sika deer (Cervus nippon yesoensis) oocytes*. *Jpn J Vet Res.* 62:187-192.
- Varghese A.C., du Plessis S.S., Falcone T., Agarwal A., 2008, *Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of follicles and oocytes: challanges for fertility preservation*. *Reproductive biology and endokrinology*, 6:47, 1-10.
- Wang LH, Mullen SF, Li Y, Zhong JQ, Crister JK, Chen ZJ. *Morphological and apoptotic comparison of primordial and primary follicles in cryopreserved human ovarian tissue*. *Reprod Domest Anim* 2009;44:879-83
- Wiweko B., Maidarti M., Mansyur E., Yuningsih T., Ahmad A., Boediono A., Soebijanto S., Affandi B., 2014, *Ovarian tissue vitrification as a method for fertility preservation: A study of follicle number and morphology after vitrification*, *Journal of Minimal Stimulation IVF*, Volume 1 Issue : 3 p.148-152
- Xiao Z., Wang Y., Li L., Luo S., Li S.W., 2010, *Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation*. *Fertil Steril.* 2010;94(6):2323-8