FOLIKEL ANTRAL OVARIUM PADA PEMBERIAN ANTIBODI MONOKLONA BOVINE ZONA PELUSIDA SEBAGAI KANDIDAT IMUNOKONTRASEPSI

Milatun Khanifah[1], Sri Poeranto[2], Sutrisno[3]

[1] *Muhammadiyah Health Science Institute of Pekajangan, Pekalongan, Indonesia*
milatun_hanif@yahoo.co.id

[2] *Departement of Parasitology Faculty of Medicine University of Brawijaya, Malang, Indonesia*

[3] *Division of Fertility, Endocrinology and Reproduction, Departement of Obstetric and Gynocology, Saiful Anwar General Hospital, Malang, Indonesia*
snospogk@gmail.com

ABSTRACT

Overpopulation is still an importance issue in developing countries such as Indonesia. On the other side of the contraceptive method that is currently relied upon to handle such problems have many deficiencies that promote efforts to suppress a population of less than optimal. Development of contraceptive methods such as the use of non-hormonal targets Monoclonal antibodies bovine imunokontrasepsi ZP3 as a candidate material needs to be done. This study aims to determine the effect of Mab-bZP3 as candidate materials immunokontrasepsi against ovarian histology, namely the number of antral follicles are normal and atretic. True experimental research was conducted on 36 animals model, there were consist of three control groups and three treatment groups, respectively were analyzed on day 5th, 10th, and 20th after the treatment. The control groups were given an injection of 50 mL of Phosphate Buffer Saline and the treatment groups were given an injection of Mab bZP3 50 mL. There was no significant evidence on discrepancy effect of Mab bZP3 toward average number of normal antral follicles (p-value 0.715) and atretic antral follicles (p-value 0.604). There was no significant evidence on discrepancy effect of Mab bZP3 toward average number of atretic antral follicles (p-value 0071) between the times observation on each of the control and treatment groups. However, There was significant evidence on discrepancy effect of Mab bZP3 toward average number of normal antral follicles (p-value 0.036) between the times observation on their respective control and treatment groups. The control group were examined on day 5th, the only significant different with the control group and the treatment group were examined on the 20th day. While the average number of normal antral follicles lowest for the control group were examined on day 20, but no significant evidence on discrepancy in the treatment groups were examined on the 20th day. These results indicate that Mab bZP3 as a candidate imunocontraceptive material has no effect on follicles development, in terms of the

regulation of apoptosis and FSH receptors on the granulosa cells. Reversiblility of contraceptive methode, as demonstrated by evidance that no significant disperancy effect of Mab bZP3 toward average number of antral follicles between control and treatment groups on day 20th.

Key words: imunocontraception, Monoclonal antibody bovine zona pelusida 3, normal antral follicles, atretic antral follicles.

ABSTRAK

Kepadatan penduduk masih merupakan masalah yang penting bagi negara-negara bekembang seperti Indonesia. Di sisi lain penggunaan metode kontrasepsi yang saat ini diandalkan untuk menangani masalah tersebut memiliki bbeberapa kekurangan yang menyababkan upaya menekan jumlah penduduk kurang optimal. Pengembangan metode kontrasepsi dengan target non hormonal seperti penggunan Monoklonal antibodi bovine ZP3 sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh Mab-bZP3 sebagai kandidat bahan immunokontrasepsi terhadap histologi ovarium yaitu jumlah folikel antral yang normal dan atretik. Penelitian True experimental ini dilakukan terhadap 36 hewan coba yang terdiri dari tiga kelompok kontrol dan tiga kelompok perlakuan, masing-masing dianalisa pada hari ke-5, ke-10, dan ke-20 setelah perlakuan. Kelompok kontrol diberikan suntikan Phospat Buffer Saline 50 µl dan kelompok perlakuan diberi suntikan Mab bZP3 sebanyak 50 µl. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata jumlah folikel antral normal (p-value 0,715) maupun folikel antral atretik (p-value 0,604) antara kelompok kontrol dengan perlakuan. Tidak terdapat perbedaan yang signifikan (p-value 0.071) rata-rata jumlah folikel antral atretik antara waktu pemeriksaan pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan (p-value 0.036) rata-rata jumlah folikel antral normal antar waktu pemeriksaan pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. Kelompok kontrol yang diperiksa pada hari ke-5, berbeda signifikan hanya dengan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan yang diperiksa pada hari ke-20. Sedangkan rata-rata jumlah folikel antral normal terendah terdapat pada kelompok kontrol yang diperiksa pada hari ke-20, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diperiksa pada hari ke-20. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa Mab bZP3 sebagai kandidat bahan imunokontrasepsi tidak berpengaruh terhadap perkembangan folikel, dalam hal regulasi apoptosis dan fungsi reseptor FSH pada sel granulosa. Efek kontrseptif bersifat reversible, yang ditunjukkan dengan tidak adanya perbedaan yang signifikan jumlah folikel antral antara kelompok kontrolndan perlakuan pada hari ke-20.

Kata Kunci: imunokontrasepsi, Monoclonal antibodi bovine zona pelusida 3, folike antral normal, folikel antral atretik.

PENDAHULUAN

Populasi penduduk dunia diperkirakan mencapai lebih dari sembilan milyar pada tahun 2050 [1]. Salah satu upaya untuk menangani masalah overpopulasi tersebut adalah mencari target suatu bahan sebagai kandidat metode kontrasepsi [2]. Pengembangan metode kontrasepsi untuk mengontrol fertilitas, di masa mendatang difokuskan pada perbaikan metode kontrasepsi yang sudah ada sekarang ini dalam hal kemanjuran, efek samping, durasi dan aksi kerja, kemudahan penggunaan, proses produksi dan biaya, tidak mengganggu kesehatan dan dengan target baru non-hormonal [3].

Salah satu upaya yang dilakukan untuk mendapatkan kandidat metode kontrasepsi yang aman dan reversibel adalah pengembangan metode

immunokontrasepsi. Immunokontrsepsi merupakan metode penghambatan fertilisasi dan perkembangan melalui cara imunologis. Induksi respon imun oleh antigen yang berperan terhadap interaksi gamet secara spesifik merupakan salah satu pendekatan untuk immunokontrasepsi. Antigen Zona Pellucida (ZP) efektif digunakan sebagai imunokontrasepsi pada berbagai jenis hewan. Pada mamalia Zona Pellucida tersusun atas beberapa jenis glikoprotein pada tiap spesies, yang diberinama ZP1, ZP2, ZP3, dan ZP4. ZP3 merupakan glikoprotein major dari zona pellucida yang berperan sebagai reseptor spermatozoa, menginduksi antibodi serta menimbulkan infertilitas yang reversibel tanpa menyebabkan gangguan pada ovarium [4].

Sumitro dan kelompoknya dalam berbagai rangkaian penelitian di bidang immunokontrasepsi menggunakan bahan dasar ZP3 dari sapi. ZP3 sapi dipilih karena dari penelitian mereka menunjukkan reaksi interspesifik antibodi terhadap zona ZP (anti-bZP3) di antara kelas mamalia yaitu mencit, tikus putih, kambing dan sapi [5]. Selain itu, penggunaan ZP3 sapi juga dilakukan mengingat limbah ovarium sapi dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) yang belum termanfaatkan dengan maksimal dapat digunakan sebagai sumber ZP3 [6].

Penelitian imunokontrasepsi berbahan dasar zona pelusida sapi telah dilakukan oleh peneliti sebelumnya. Namun, mereka lebih banyak mengkaji pengaruhnya terhadap tingkat kehamilan, seperti yang dilakukan oleh Pantiwati. Penelitian dengan memberikan passive imunisasi anti bZP3 terhadap 36 tikus (100µl anti bZP3 dalam 100µl Complet Freund's Adjuvant/CFA) dan 36 mencit (50µl anti bZP3 dalam 50µl Complet Freund's Adjuvant/CFA) menunjukkan bahwa titer antibodi tertinngi didapat pada serum mencit perlakuan yang diinkubasi selama 63 hari. Mencit perlakuan, mencit dan tikus kontrol terjadi kebuntingan terjadi kebuntingan 100% sampai hari ke-126, sedangkan tikus perlakuan mengalami kegagalan 4,5%[7]. Penelitian menggunakan monoklonal antibodi bZP3 (Mab bZP3) masih terus dilakukan dalam rangka mendapatkan kandidat bahan yang memiliki spesifisitas yang lebih baik sehingga lebih efektif dan aman untuk menghambat fertilisasi/antifertilisasi [4]. Pada penelitian ini penggunaan Mab-bZP3 sebagai kandidat bahan immunokontrasepsi dilihat pengaruhnya terhadap histologi ovarium yaitu jumlah folikel antral yang normal dan atretik.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian True Eksperimen dengan Nested Design yang dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang dan Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Hewan Coba

Penelitian ini menggunakan mencit Mus Musculus Balb/c betina yang berusia 1-2 bulan, yang didapatkan dari Unit Pra-Klinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta berjumlah 36 ekor. Mencit dibagi menjadi enam kelompok yaitu 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok kontrol yang masing-masing dibedah pada hari ke-5, ke-10, dan ke-20.

Pemberian Imunisasi Pasive Mab bZP3 dan PBS

Pemberian Mab bZP3 dan Phospate Buffer Saline (PBS) dilakukan pada fase estrus. Mencit perlakuan mendapat Mab bZP3 sebanyak 50 µl yang dicampur dengan 50µl adjuvan, sedangkan mencit kontrol mendapat 50µl PBS. Injeksi dilakukan secara Intra Muskuler.

Pembuatan preparat histopatologis

Pemotongan organ dilakukan setelah melewati proses fiksasi organ, dehidrasi, clearing, impregnansi dan embedding. Penyayatan organ dilakukan menggunakan microtome dengan ketebalan 4 µm.

Pengamatan Jumlah Folikel Antral

Proses identifikasi folikel normal dan atretik

pada folikel antral dilakukan dengan pewarnaan Haematoksilin Eosin. Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop cahaya. Sel folikel dihitung di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 400x. Ciri folikel atretik menurut JuniquerA (1997) adalah folikel dengan ciri terlepasnya sel granulosa dari membrane basal, terdapat banyak celah di antara sel-sel penyusun membrane granulosa serta terlepasnya sel-sel folikel dan masuk ke dalam antrum folikuli.

ANALISA STATISTIK

Hasil pemeriksaan jumlah folikel antral normal dan atretik ditampilkan dalam bentuk mean±SD dan dianalisa secara statistik menggunakan Nested ANOVA. P value kurang dari 0,005 dinyatakan tidak signifikan secara statistik. Pengujian asumsi normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Saphiro Wilk. Pengujian asumsi homogenitas ragam dilakukan dengan menggunakan uji Levene.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dalam penelitian ini, data jumlah folikel antral normal dan atretik bernilai kecil, sehingga sebelum dilakukan analisis, dilakukan proses transformasi data dengan transformasi untuk folikel antral atretik dan Log (Y+0.5) untuk data folikel normal.

Hasil uji normalitas pada folikel antral normal yaitu nilai koefisien 0,989 dan p-value > 0.100. Hasil uji normalitas pada folikel antral atretik yaitu nilai koefisien 0,984 dan p-value > 0.100. Ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada kedua variabel tersebut telah terpenuhi.

Hasil uji homogenitas pada folikel antral normal yaitu nilai koefisien 2.09 dan p-value 0.094. Hasil uji homogenitas pada folikel antral atretik yaitu nilai koefisien 1.22 dan p-value 0.326. Ini menunjukkan bahwa asumsi normalitas pada kedua variabel tersebut telah terpenuhi.

Jumlah Folikel Antral Normal dan Atretik pada pemberian Antibodi Mab-bZP3

Berikut deskriptif jumlah folikel antral normal dan atretik pada masing-masing kelompok :

Tabel 1.
Deskriptif Jumlah Folikel Antral Normal dan Atretik

Antibodi	Pemeriksaan	Mean ± SD	
		Jumlah Folikel Antral Normal	Jumlah Folikel Antral Atretik
Kontrol	5 hari	5.00 ± 6.13	3.17 ± 3.06
	10 hari	2.50 ± 3.33	2.83 ± 2.56
	20 hari	0.50 ± 0.84	4.50 ± 3.15
Perlakuan	5 hari	2.17 ± 0.98	6.83 ± 1.47
	10 hari	2.00 ± 1.1	5.00 ± 0.89
	20 hari	0.83 ± 1.17	3.00 ± 2.37

deskriptif ditunjukkan bahwa pada kelompok kontrol, rata-rata jumlah folikel antral normal terendah didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-20 yakni sebesar 0.50 ± 0.84 dan tertinggi didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-5 yakni sebesar 5.00 ± 6.13. Pada kelompok perlakuan, rata-rata jumlah folikel antral normal terendah didapatkan pada

kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-20 yakni sebesar 0.83 ± 1.17 dan tertinggi didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-5 yakni sebesar 2.17 ± 0.98.

Rata-rata jumlah folikel antral atretik pada kelompok kontrol, terendah didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-10 yakni sebesar 2.83 ± 2.56. dan tertinggi didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-20 yakni sebesar 4.50 ± 3.15. Rata-rata jumlah folikel antral atretik terendah didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-20 yakni sebesar 3.00 ± 2.37. dan tertinggi didapatkan pada kelompok mencit yang diperiksa pada hari ke-5 yakni sebesar 6.83 ± 1.47.

Berdasarkan tabel 1. jumlah folikel antral normal semakin sedikit seiring dengan semakin bertambahnya usia saat dilakukan pemeriksaan. Pola perubahan folikel normal seperti ini mirip dengan proses fisiologis yang terjadi pada perkembangan folikel di ovarium. Seiring dengan bertambahnya usia wanita, jumlah folikel berkurang sehingga menurunlah jumlah folikel antral[8]. Jumlah folikel antral dapat digunakan sebagai metode untuk memperkirakan jumlah oosit yang sehat dalam ovarium pada masa reproduksi dan memiliki hubungan diagnostik yang penting dalam keluarga berencana [9]. Jumlah folikel antral menentukan jumlah oosit, yang secara klinis berhubungan dengan outcome berupa kehamilan atau kelahiran hidup, tergantung pada kualitas dan kuantitas oosit [10].

Untuk menguji perbedaan rata-rata jumlah folikel antral normal dan atretik dilakukan proses pengujian dengan menggunakan Nested ANOVA kemudian dilanjutkan dengan uji lanjut LSD 5%. Berikut hasil perbandingan rata-rata jumlah folikel antral dengan menggunakan Nested ANOVA dan LSD 5% :

Tabel 2.
Hasil Perbandingan Rata-Rata Jumlah Folikel Antara Kontrol dan Perlakuan Menggunakan Nested ANOVA dan LSD 5%

Antibodi	Mean ± SD	
	Jumlah Folikel Antral Normal	Jumlah Folikel Antral Atretik
Kontrol	2.67 ± 4.26	3.5 ± 2.85
Perlakuan	1.67 ± 1.19	4.94 ± 2.26
p-value	0.715	0.064

Hasil perbandingan rata-rata jumlah folikel antral normal dan atretik didapatkan p-value lebih dari 0,05 pada semua variabel. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan rata-rata jumlah folikel antral normal maupun folikel antral atretik antara kelompok kontrol dengan perlakuan.

Tidak terdapatnya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada kedua jenis folikel antral, baik normal maupun atretik menjadi indikasi bahwa pemberian Mab b-ZP3 hanya bekerja untuk menutup reseptor ZP3, tidak menyebabkan gangguan pada sel granulosa. Dijelaskan bahwa sel granulosa terbukti sebagai sel utama dalam ovarium yang menyediakan kondisi fisik dan kimia yang adekuat berguna bagi perkembangan folikel dan oosit normal. Hal ini berlangsung selama proses folikulogenesis

diferensiasi sel pregranulosa menjadi sel granulosa yang matur [11].

Hasil penelitian ini juga memberi petunjuk bahwa pemberian mab-bZP3 tidak mempengaruhi reseptor FSH yang terdapat pada sel granulosa. Reseptor FSH pada folikel hanya dimiliki oleh sel granulosa[12]. Proses seleksi folikel dominan memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap FSH, yang menyebabkan peningkatan ekspresi reseptor FSH. Hasilnya adalah, peningkatan inhibin dan estradiol memicu mekanisme feedback negatif yang mencegah folikel melanjutkan proses perkembangan. Selain sel granulosa, sel teka juga memainkan peran penting, karena produksi hormon steroid dibutuhkan untuk pertumbuhan folikel yang normal [13].

Jumlah folikel antral normal atau yang sehat secara morfologi berkaitan dengan keberlangsungan fungsi reproduksi seorang wanita. Dijelaskan bahwa pada tahap antral, kebanyakan folikel mengalami atresia. Namun, di bawah stimulasi gonadotropin yang optimal setelah pubertas, sebagian kecil di antaranya dibebaskan (pengambilan secara siklik / cyclic recruitment) untuk mencapai tahap pre-ovulasi. Akhirnya, berkurang jumlah folikel pada kumpulan folikel pada fase istirahat menyebabkan folikel ovarium menyusut [14].

Tidak adanya perbedaan yang signifikan jumlah folikel antral yang mengalami atresia pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Mab-bZP3 tidak menyebabkan regulasi apoptosis pada folikel. Dikemukakan bahwa apotosis folikular diperlukan untuk mengatur perkembangan folikel primordial sampai ke tahap preovulatory dan hanya satu yang dominan akhirnya mengalami ovulasi, sedangkan lebih dari 99% folikel mengalami atresia. atresia diatur oleh kematian sel terprogram (apoptosis) dan survival promotoring factor termasuk gondaotropin dan regulator ontraovarian (steroid gondala, sitokin, protein intraseluler) [15] [16].

Berikut hasil perbandingan rata-rata jumlah folikel antral normal dan atretik antara waktu pemeriksaan :

Tabel 3.
Hasil Perbandingan Rata-Rata Jumlah Folikel Antara Waktu Pemeriksaan Menggunakan Nested ANOVA dan LSD 5%

Antibodi	Pemeriksaan	Mean ± SD		
		Jumlah Folikel Antral Normal	Jumlah Folikel Antral Atretik	
Kontrol	5 hari	5.00 ± 6.13	3.17 ± 3.06	a
	10 hari	2.50 ± 3.33	2.83 ± 2.56	abc
	20 hari	0.50 ± 0.84	4.50 ± 3.15	c
Perlakuan	5 hari	2.17 ± 0.98	6.83 ± 1.47	ab
	10 hari	2.00 ± 1.10	5.00 ± 0.89	ab
	20 hari	0.83 ± 1.17	3.00 ± 2.37	bc
p-value		0.036	0.071	

Keterangan: Pada mean±sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang

signifikan dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang signifikan.

Tabel 3. menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan (p-value 0.071) rata-rata jumlah folikel antral atretik antara waktu pemeriksaan pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan. Namun, terdapat perbedaan yang signifikan (p-value 0.036) rata-rata jumlah folikel antral normal antara waktu pemeriksaan pada masing-masing kelompok kontrol dan perlakuan.

Berdasarkan hasil uji LSD 5%, ditunjukkan bahwa rata-rata jumlah folikel antral normal tertinggi terdapat pada kelompok kontrol yang diperiksa pada hari ke-5, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok kontrol yang diperiksa pada hari ke-10, dan kelompok perlakuan yang diperiksa pada hari ke-5 dan ke-10. Sedangkan rata-rata jumlah folikel antral normal terendah terdapat pada kelompok kontrol yang diperiksa pada hari ke-20, namun tidak berbeda signifikan dengan kelompok perlakuan yang diperiksa pada hari ke-20.

Dari tabel 3. dapat dilihat, perbedaan yang signifikan hanya terjadi antara kelompok kontrol hari ke-5 dengan hari ke-20 baik kelompok kontrol dan kelompok perlakuan, dan antara kelompok kontrol hari ke-20 dengan kelompok perlakuan hari ke-5 dan ke-10. Ini menjadi bahwa Mab bZP3 dapat diharapkan sebagai metode kontrasepsi yang memiliki ciri berdaya guna (efektif) dalam mencegah kehamilan dan bersifat reversible. Sifet efektif ditunjukkan oleh adanya antara kelompok kontrol hari ke-20 dengan kelompok perlakuan hari ke-5 dan ke-10. Sifat reversible ditunjukkan dengan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol hari ke-5 dengan hari ke-20 baik kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Diterangkan bahwa secara umum persyaratan metode kontrasepsi ideal antara lain aman, berdaya guna, harga terjangkau dan bersifat reversibel [2].

Sifat efektif dan reversible dari suatu metode kontrasepsi sangat sesuai bagi pengguna kontrasepsi yang berada dalam rentang reproduksi sehat, yaitu mereka yang paling mungkin untuk mengalami kehamilan. Saifudin (2012) menjelaskan bahwa dalam penggunaan kontrasepsi rasional, berdasarkan usia, maka pada usia reproduksi sehat (20-35 tahun), pilihan utama kontrasepsi adalah yang memiliki ciri efektifitas tinggi dan mampu mengembalikan kesuburan [17].

DAFTAR PUSTAKA

1. Cleland, J., et al., *Family planning: the unfinished agenda.* The Lancet, 2006. 368(9549): p. 1810-1827.
2. Soewart, S. and S.B. Sumitro, *Perkembangan Kontrasepsi, in Imunokantrasepsi: Konsep-Konsep Dasar dan Bunga Rampai Penelitian2011,* Airlangga University Press: Surabaya.
3. Rabe, T., *Contraception-Update and Trends. Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology, 2007.* 4(6): p. 337-357.
4. Sumitro, S.B. and Aulanni'am, *Antibodi Zona Pellusida dan Aplikasinya Sebagai Kandidat Imunokontrasepsi Wanita, in Imunokontrasepsi Konsep Dasar dan Bunga Rampai Penelitian2011,* Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP): Surabaya. p. 61-66.
5. Sumitro, S.B. and Aulanni'am, *Rangkaian Penelitian Penemuan Imunokontrasepsi Wanita Berbasis Molekul Antibodi Hasil Induksi bZP3 dan bZP3DG, in Imunokontrasepsi Konsep Dasar dan Bunga Rampai Penelitian2011,* Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP): Surabaya. p. 67-81.
6. Widodo, E. and Aulanni'am, *Specificity of antibody bovine zonna pellucidae 3 to rabbit ZP3 based on bZP3 as contraceptive antigens.* Indo. J. Chem, 2005. 5(2): p. 182-187.
7. Pantiwati, Y., *Passive immunization of anti bZP3 (zona pelusida3) in wistar rat (Rattus Norvegicus) and mouse (Mus Musculus).* Media Peternakan, 2012. 1: p. 163-169.
8. Loho, M.F., *Cadangan Ovarium 9Ovarian reserve),* in Maj Obstet Ginekol Indones2010. p. 43-46.
9. Ireland, J., et al., *Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. Biology of reproduction, 2008.* 79(6): p. 1219-1225.
10. Roudebush, W.E., W.J. Kivens, and J.M. Mattke, *Biomarkers of ovarian reserve.* Biomarker insights, 2008. 3: p. 259.
11. Palma, G.A., et al., *Biology and biotechnology of follicle development.* The Scientific World Journal, 2012. 2012.
12. Johnson, M. and B. Everitt, *Essential reproduction. 2000,* Oxford: Blackwell Sciences Ltd. Google Scholar.
13. Chedrese, P.J., *Reproductive Endocrinology: A Molecular Approach2009:* Springer.
14. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles 1. Endocrine reviews, 2000.* 21(2): p. 200-214.
15. Avellaira, C., et al., *Expression of molecules associated with tissue homeostasis in secretory endometria from untreated women with polycystic ovary syndrome.* Human Reproduction, 2006. 21(12): p. 3116-3121.
16. Villarroel, C., et al., *Polycystic ovarian morphology in adolescents with regular menstrual cycles is associated with elevated anti-Müllerian hormone.* Human Reproduction, 2011. 26(10): p. 2861-2868.