

# Pengaruh Transplantasi Ovarium pada Kelinci Lokal Bunting Semu Terhadap Peningkatan Hormon Kortisol

(Effect of Ovarian Transplantation in Pseudopregnant Rabbits on Elevation of Cortisol Concentration)

Syafruddin<sup>1</sup>, Angghian Siti Safur<sup>2</sup>, Tongku Nizwan Siregar<sup>3\*</sup>, Gholib<sup>4</sup>, Roslizawaty<sup>1</sup>, Amalia Sutriana<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Klinik, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>2</sup>Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>3</sup>Laboratorium Reproduksi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>4</sup>Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

<sup>5</sup>Laboratorium Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala

\*Penulis untuk korespondensi: siregar@unsyiah.ac.id

Diterima 30 Agustus 2022, Disetujui 20 Oktober 2022

## ABSTRAK

Implantasi atau proses memindahkan organ tubuh dari satu makhluk hidup ke makhluk hidup yang lain dapat menginisiasi terjadinya stres. Penelitian ini bertujuan mengetahui peningkatan konsentrasi hormon kortisol pada kelinci lokal bunting semu yang mendapat transplantasi ovarium sapi aceh dengan durasi yang berbeda. Penelitian ini menggunakan sembilan ekor kelinci betina lokal berumur 3-5 tahun, bobot badan 1,5-2,9 kg. dibagi dalam tiga kelompok perlakuan (n=3) yakni kelompok transplantasi ovarium sapi di dalam uterus kelinci lokal bunting semu selama 3 hari (K1), 5 hari (K2), dan 7 hari (K3). Sampel feses untuk pemeriksaan konsentrasi kortisol diambil pada waktu sebelum dan setelah transplantasi. Konsentrasi metabolit hormon kortisol diukur dari sampel feses menggunakan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hasil penelitian menunjukkan rerata konsentrasi hormon kortisol pada kelinci H-3 sebelum transplantasi ovarium sapi aceh adalah 125,12±74,68 ng/g. Konsentrasi kortisol sesudah transplantasi pada kelompok K1; K2; dan K3 masing-masing adalah 433,94±207,44; 176,74±83,00; 343,28±178,42 ng/g (P>0,05). Disimpulkan bahwa transplantasi ovarium sapi aceh pada kelinci lokal bunting semu cenderung meningkatkan hormon kortisol namun durasi ovarium di dalam uterus tidak memengaruhi konsentrasi kortisol.

**Kata kunci:** bunting semu, kortisol, kelinci lokal, transplantasi

## ABSTRACT

Implantation or the process of transferring organs from one living being to another can induce stress. The aim of this study is to determine the increase in the concentration of the hormone cortisol in pseudo-pregnant native rabbits that received ovarian transplantation from Aceh cattle with different durations. In this study, nine native female rabbits aged 2 to 3 years, and with body weights ranging from 1.5 to 2.9 kg were used and divided into three treatment groups (n=3), namely the group in which bovine ovaries were transplanted into the uterus of pseudo-pregnant native rabbits for 3 days (K1), 5 days (K2), and 7 days (K3). Samples were collected before and after transplantation to examine cortisol concentration. The concentration of cortisol hormone metabolites was measured in the samples by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed that the mean cortisol concentration in H-3 rabbits before ovarian transplantation in Aceh cattle was 125.12±74.68 ng/g. The cortisol concentrations after transplantation in the K1 group; K2; and K3 were 433.94±207.44; 176.74±83.00; 343.28±178.42 ng/g (P>0.05). It can be concluded that transplantation of ovaries from Aceh cattle into pseudo-pregnant native rabbits leads to an increase the hormone cortisol, but the length of time the ovaries remain in the uterus has no affect the cortisol concentration.

**Keywords:** pseudopregnancy, cortisol, transplant, local rabbits

## PENDAHULUAN

Sapi aceh termasuk dalam salah satu rumpun sapi lokal asli (plasma nutfah) yang dilindungi di Indonesia dan telah ditetapkan oleh Kementerian Pertanian, dengan nomor ketetapan 2907/Kpts/OT.140/06/2011. Sapi aceh juga telah ditetapkan dalam Standar Nasional Indonesia (SNI) oleh Badan Standardisasi Nasional No.7651.3 tahun 2013. Sapi aceh merupakan kekayaan sumberdaya genetik yang saat ini mulai mengalami ancaman baik dari aspek jumlah maupun kemurniannya. Hal ini disebabkan masuknya *breed* sapi luar yang tidak terkontrol (Ikhsanuddin *et al.*, 2018).

Upaya peningkatan populasi dan produktivitas sapi aceh telah dilakukan melalui penerapan beberapa teknologi reproduksi, antara lain teknologi sinkronisasi estrus dengan prostaglandin F<sub>2</sub> alpha (Hafizuddin *et al.*, 2012; Melia *et al.*, 2013; Siregar *et al.*, 2015), sinkronisasi estrus dengan *presynch-ovsynch* (Adam *et al.*, 2017), aplikasi inseminasi buatan (IB) sapi aceh menggunakan bibit sapi unggul (Tarmizi *et al.*, 2018), superovulasi dengan PMSG dan hCG (Siregar *et al.*, 2012; Amiruddin *et al.*, 2013), dan transfer embrio (Siregar *et al.*, 2012).

Pelaksanaan transfer embrio (TE) diawali dengan upaya memperoleh embrio dengan kualitas baik sehingga layak untuk ditransfer pada resipien. Embrio berasal dari ovum yang telah mengalami fertilisasi sebagai hasil dari proses perkawinan baik secara alami ataupun IB. Perolehan kualitas embrio yang baik saat koleksi embrio pada umumnya mengalami kendala. Menurut Feng *et al.* (2010) dan Mohammed (2012), salah satu upaya untuk mengatasi kendala tersebut adalah menghasilkan embrio dengan menggunakan teknologi *in vitro fertilisation* (IVF).

Folikel dalam teknologi IVF dapat berasal dari limbah ovarium yang dipotong di Rumah Potong Hewan (RPH). Banyaknya ovarium yang diperoleh dari RPH dapat dijadikan sumber oosit yang siap untuk dibuahi. Namun, ovarium namun tidak dapat bertahan lama jika disimpan walaupun dalam suhu dingin sehingga diperlukan teknologi pengawetan ovarium yang dapat menjaga kualitas folikel di dalamnya. Beberapa peneliti telah melaporkan bahwa salah satu teknologi populer untuk pengawetan ovarium adalah implantasi intra/interspesies dengan atau tanpa vitrifikasi korteks ovarium atau keseluruhan ovarium (Parkening *et al.*, 1985; Gunasena *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001; Cushman *et al.*, 2002).

Transplantasi ovarium dapat dilakukan pada hewan coba, salah satunya adalah kelinci. Kelinci bunting semu adalah hewan model yang biasa digunakan untuk mempelajari endokrinologi reproduksi (Dugre

*et al.*, 1989), untuk pengobatan endometriosis (Yuan *et al.*, 2010), dan untuk transplantasi ovarium sebagai sumber oosit (Sumarmin, 2010). Hal ini dapat dilakukan karena sejak awal kebuntingan, kelenjar yang terdapat pada endometrium uterus kelinci akan aktif menghasilkan dan mengeluarkan sekreta ke dalam lumen uterus sebagai cadangan nutrisi untuk embrio menjelang terjadinya implantasi (Colby, 1986). Sumber energi ini dapat dimanfaatkan untuk memperlambat proses autolisis pada organ yang ditransplantasikan.

Tranplantasi merupakan proses memindahkan organ tubuh dari satu makhluk hidup ke makhluk hidup lain dengan tujuan tertentu melalui tindakan operasi. Stres merupakan salah satu efek dari transplantasi maupun operasi lainnya (Peric *et al.*, 2018) yang kemungkinan dapat menyebabkan sistem kekebalan *host* menolak organ yang ditransplantasikan. Hal ini dapat memengaruhi tingkat keberhasilan transplantasi yang dilakukan (Diehl *et al.*, 2017). Kelemahan penggunaan kelinci untuk transplantasi organ adalah stres yang dihasilkan akibat perlakuan. Kelinci meskipun sering dipakai untuk hewan model, namun termasuk hewan yang sangat sensitif terhadap stres (Mapara *et al.*, 2012). Jang *et al.* (2017) melaporkan peningkatan kortisol setelah pembedahan pada kelinci yang mengalami gangguan gastrointestinal.

Stres akibat transplantasi akan merangsang sekresi *corticotropin-releasing hormone* (CRH) sehingga menggertak hipofisa mengeluarkan *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) dan selanjutnya terjadi peningkatan hormon kortisol. Kortisol bekerja langsung terhadap ovarium dengan menghambat produksi hormon steroid yang menginduksi terjadinya apoptosis (Whirledge dan Cidlowski, 2010). Yuan *et al.* (2016) melaporkan bahwa injeksi kortisol menyebabkan cedera oosit dan apoptosis sel mukosa granulosa. Laporan mengenai kadar hormon stres pasca transplantasi ovarium sapi aceh pada kelinci bunting semu sampai saat ini belum pernah dilaporkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peningkatan hormon kortisol setelah transplantasi ovarium sapi aceh pada uterus kelinci bunting semu dengan perbedaan lama ovarium di dalam uterus.

## BAHAN DAN METODE

### *Ethical clearance*

Penelitian ini telah memperoleh sertifikat laik etik dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala no. 139/KEPH/VII/2020. Dalam penelitian ini digunakan sembilan ekor kelinci betina lokal bunting semu, berumur 2-3 tahun dan

bobot badan 1,5-2,9 kg. Sebelum perlakuan, kelinci diadaptasikan selama 30 hari. Semua kelinci dipelihara pada kandang individu berukuran 60x43x48 cm untuk mengondisikan semua hewan dalam status sehat secara klinis. Pakan diberikan dalam bentuk pelet (Pur Babi 551) dua kali sehari dan air minum diberikan secara ad libitum.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan analisis varian satu arah yang terdiri atas tiga kelompok perlakuan yaitu K1 = ovarium berada di uterus kelinci selama tiga hari, K2 = ovarium berada di uterus kelinci selama lima hari dan K3 = ovarium berada di uterus kelinci selama tujuh hari. Masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Sampel feses dikoleksi mulai tiga hari sebelum transplantasi (H-3) sampai ovarium diangkat dari uterus.

### Induksi Bunting Semu

Induksi bunting semu pada kelinci dilakukan menggunakan PMSG dan hCG. Pilihan ini mengacu pada Syafuruddin et al. (2022) bahwa metode induksi dengan PMSG dan hCG lebih baik dibandingkan dengan pemberian hCG, GnRH, atau kopulasi tiruan. Kelinci diinjeksi dengan 100 IU PMSG (PG 600, Folligon™, Intervet, Boxmeer, dan Holland) secara intramuskulus dan diikuti tiga hari kemudian dengan injeksi 75 IU hCG (Chorulon, Intervet, Boxmeer, dan Holland) secara intravena (K3) sesuai petunjuk Schlegel et al. (1988). Transplantasi ovarium dilakukan pada hari ke- 8 (hari ke- 0 adalah hari ketika injeksi hCG).

### Prosedur Pembedahan

Kelinci betina resipien yang diinduksi bunting dilakukan anestesi umum dengan menginjeksikan 0,1 ml zoletil/kg bobot badan secara intramuskulus. Kelinci setelah teranestesi diletakkan di atas meja bedah dengan posisi *dorsal recumbency* dan dicukur rambut di sekitar daerah *linea alba*. Bagian kelinci yang dibedah diusap dengan alkohol 70% dan iodine tincture 3% secara sirkuler (Techakumphu et al., 1987).

Pembedahan dilakukan pada daerah *linea alba* dengan posisi *dorsal recumbency* sepanjang 3-4 cm (kulit, musculus transversus abdominis, dan peritoneum). Insisi sepanjang 1 cm pada korpus uteri selanjutnya dibuat. Potongan jaringan ovarium sapi/ ovarium intake dimasukkan dan didorong ke arah kornua uteri melalui celah insisi tersebut. Transplantasi potongan jaringan ovarium dilakukan dua buah untuk setiap kornua uteri kelinci. Insisi pada tunika mukosa (endometrium) yang melapisi uterus bagian dalam setelah ovarium sapi ditransplantasikan, dijahit

dengan pola *continuous simple suture*. Tunika serosa (perimetrium) yang merupakan lapisan uterus bagian luar dijahit menggunakan jahitan *lambert continuous suture*. Penjahitan juga dilakukan terhadap peritoneum dengan pola jahitan *continuous simple suture*, dan musculus transversus abdominis dengan pola jahitan yang sama. Pola jahitan *simple interrupted suture* pada kulit dilakukan untuk menutup luka. Pemilihan benang yang digunakan berupa jenis benang *absorbable* untuk menjahit uterus, peritoneum dan musculus transversus abdominis sedangkan jenis benang *non-absorbable* digunakan untuk menjahit area kulit. Betadine dioleskan di atas jahitan tersebut sesudah proses penjahitan luka selesai. Kelinci selanjutnya dipindahkan kembali ke kandangnya menjelang siuman. Kelinci resipien kemudian dipelihara kembali dan agar tidak terjadi infeksi dilakukan pengolesan gentamicin setiap pagi dan sore hari (Sumarmin, 2010). Lama ovarium berada di dalam uterus kelinci adalah 3 hari (K1), 5 hari (K2), dan 7 hari (K3).

### Ekstraksi Sampel Feses

Sampel feses diekstraksi menggunakan metode seperti yang dilaporkan Gholib et al. (2020). Tahap pertama sampel di-*thawing* pada suhu 50°C selama 1-2 jam. Sampel selanjutnya dihomogenkan dan sebanyak 0,55 g sampel feses segar dimasukkan ke dalam tube yang berisi 4,5 ml methanol 80%. Sampel feses selanjutnya diekstraksi menggunakan multivortexer (Brand, USA) dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. sampel setelah itu, disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Tahap akhir, supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam *microtube* dan disimpan di dalam *freezer* -20°C sebelum dilakukan pengukuran konsentrasi metabolit kortisol.

### Analisis Hormon Kortisol

Pengukuran konsentasi metabolit kortisol dilakukan dengan menggunakan "in house assay yaitu Cortisol Metabolit ELISA kit" yang telah dikembangkan oleh Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala kerjasama dengan University of Zurich. Kit ELISA ini merupakan kit yang secara spesifik mampu mengukur konsentrasi hormon kortisol pada sampel feses dan urin. Metode yang digunakan ialah *field friendly extraction* seperti yang dijelaskan oleh Nugraha et al. (2017) dan Gholib et al. (2018). Prosedur pengukuran konsentrasi metabolit kortisol mengacu pada Gholib et al. (2017) dan Gholib et al. (2018). Tahap pertama ekstrak feses diencerkan dengan larutan *buffer assay*. Sebanyak 50 µl ekstrak yang telah diencerkan dimasukkan ke

dalam plat (microplate) yang telah dilapisi (*coating*) dengan *goat-anti-rabbit* IgG. Sample selanjutnya ditambahkan 50 µl antibodi dan 50 µl enzim ke dalam tiap sumur plat dan diinkubasi selama satu malam ( $\pm 18$  jam) pada suhu 4-8°C. Plat selanjutnya dicuci dan ditambahkan streptavidin-peroxidase dan diinkubasi kembali pada kamar gelap dan suhu ruang 18-25°C selama 30 menit. Plat dicuci kembali, dan kemudian ditambahkan larutan substrat yang terdiri atas 1.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,4 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine di dalam 10 mM natrium asetat pH 5,5 dan diinkubasi pada kamar gelap dan suhu ruang selama kurang lebih 45 menit. Reaksi enzimatik kemudian dihentikan dengan menambahkan 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sebanyak 50 µl ke setiap sumur plat, sehingga terjadi perubahan warna. Intensitas warna/absorban dibaca menggunakan ELISA Reader dan program MPM 6 pada 450 nm.

### Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis menggunakan *one way anova* menggunakan program SPSS 21.

## HASIL

Hasil penelitian terhadap rerata konsentrasi hormon kortisol pada kelinci lokal bunting semu 3 hari (H-3) sebelum transplantasi ovarium sapi aceh adalah 125,12 $\pm$ 74,68 ng/g, dengan kadar terendah adalah 1,81 ng/g dan tertinggi 263,97 ng/g (Tabel 1). Konsentrasi kortisol kelinci bunting semu setelah transplantasi disajikan pada Tabel 2.

## PEMBAHASAN

Besarnya rentang perbedaan antara kadar terendah dan tertinggi dari hormon kortisol kelinci lokal bunting semu sebelum transplantasi, mengindikasikan bahwa 88,89% kelinci lokal bunting semu mengalami stres. Hal ini mungkin disebabkan oleh masa aklimatisasi yang kurang lama maupun stres yang didapat dari lingkungan.

Hasil analisis statistik menggunakan *one way anova* antar kelompok perlakuan dari kelinci lokal bunting semu setelah transplantasi menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata dari konsentrasi hormon kortisol ( $P > 0,05$ ). Kadar kortisol sebelum dan setelah transplantasi secara statistik menunjukkan perbedaan yang tidak nyata antar kelompok perlakuan, namun secara deskriptif memperlihatkan K2 (176,74 $\pm$ 83,00 ng/g) memiliki rerata kortisol yang lebih rendah dibandingkan K1 (433,94 $\pm$ 207,44 ng/g)

dan K3 (343,28 $\pm$ 178,42 ng/g). Hal ini mengindikasikan bahwa keberadaan ovarium sapi aceh selama lima hari yang ditransplantasikan dalam uterus kelinci lokal bunting semu memiliki tingkat stres yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang lain.

Kortisol merupakan hormon esensial dan memiliki beberapa efek pada sebagian jaringan tubuh. Aksi glukoneogenik pada hormon kortisol bertanggung jawab pada pemulihan dari paparan stres. Sebagian besar hormon kortisol bersirkulasi pada protein dan plasma dengan sejumlah kecil sirkulasi dalam bentuk yang bebas dan aktif secara biologis (Perry & Medback, 2013). Hormon stres dalam keadaan normal, dilepaskan dalam jumlah kecil, tetapi dalam menghadapi stres, kadar hormon ini meningkat secara dramatis (Anthony & Frank, 2018).

Segala sesuatu yang dapat menyebabkan stres disebut stresor. Segala macam stresor baik fisik maupun mental dapat meningkatkan sekresi *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) yang merangsang sekresi kortisol dapat menekan sistem imun terutama sistem imun adaptif berupa limfosit (Guyton, 2007). Von-Borrel (2001) selanjutnya menambahkan bahwa ACTH akan berpengaruh pada stereokimia dan akan meningkatkan pembuangan kolesterol dan modifikasi enzimatis hormon glukokortikoid dalam bentuk kortisol dan kortikosteron.

Kortisol secara umum membantu menjaga homeostasis dalam tubuh dan membantu metabolisme energi, reproduksi, respons imun, proses inflamasi, pertumbuhan, dan kadar glukokortikoid yang berdampak negatif pada kinerja reproduksi atau respon imun (Nedic et al., 2017). Stres reproduksi dipengaruhi oleh pakan, manajemen pemeliharaan, kesehatan, hormon dan lingkungan (Raynardia et al., 2021). Guyton (2007) menyatakan bahwa beberapa jenis stres yang dapat meningkatkan pelepasan kortisol di antaranya seperti; hampir pada semua jenis trauma, infeksi, kepanasan atau kedinginan yang hebat, penyuntikan *norepinefrin* dan obat-obatan, pembedahan, serta penyuntikan bahan yang bersifat nekrosis di bawah kulit.

Terapi imunosupresi rutin diterapkan untuk mencegah kerusakan atau penolakan transplantasi. Wennberg et al., (2001) menyampaikan bahwa protokol imunosupresi adalah elemen kunci dalam suatu percobaan transplantasi. Menurut Diehl et al., (2017), diperlukan imunosupresi yang tepat untuk berhasil melakukan transplantasi eksperimental pada hewan. Prinsipnya, kelangsungan hidup jangka panjang setelah transplantasi dapat dipastikan dengan dua cara berbeda yaitu dengan manajemen pengobatan imunosupresif atau dengan induksi toleransi imunologis terhadap jaringan donor. Pengobatan

Tabel 1. Konsentrasi kortisol kelinci lokal bunting semu 3 hari sebelum transplantasi ovarium sapi aceh.

Kelinci bunting semu (n=9)	Kortisol (ng/g)
1	174,64
2	135,83
3	128,23
4	1,81
5	44,83
6	263,97
7	124,10
8	102,79
9	149,89
Rarata± SD	125,12±74,68

Tabel 2. Konsentrasi hormon kortisol antar kelompok kelinci bunting semu sebelum dan setelah transplantasi ovarium sapi aceh.

	Ulangan	Kortisol (ng/g)		
		K1	K2	K3
Sebelum	1	174,64	1,81	124,10
	2	135,83	44,83	102,79
	3	128,23	263,97	149,89
	Rerata ±SE	146,23±14,37	103,54±81,17	125,59±13,62
Setelah	1	798,37	23,47	150,47
	2	80,00	198,20	179,65
	3	423,45	308,56	699,72
	Rerata± SE	433,94±207,44	176,74±83,00	343,28±178,42

Keterangan: tidak ada perbedaan yang nyata antar kelompok kelinci bunting semu sebelum dan setelah transplantasi ( $P>0,05$ ).

imunosupresif dilakukan dengan pendekatan gabungan menggunakan konvensional agen seperti Cyclosporine (CsA), Mikofenolat mofetil (MMF) dan prenidolon dianjurkan, terutama untuk imunosupresi jangka panjang. Hasil penelitian menyimpulkan bahwa transplantasi ovarium sapi aceh pada kelinci lokal bunting semu cenderung meningkatkan hormon kortisol namun durasi ovarium di dalam uterus tidak memengaruhi konsentrasi kortisol.

“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”.

#### DAFTAR PUSTAKA

Adam M. Siregar TN, Wahyuni S, Gholib, Ramadhana CE, Ananda R, Afifuddin. 2017. Steroid level and pregnancy rate of aceh cows in response to ovulation induction using presynch-ovsynch

method. *J. Kedokt. Hewan*, 11(4): 138-141.

Amiruddin, Siregar TN, Armansyah T, Hamdan, Arismunandar, Rifki M. 2013. Steroid level of aceh's cattle induced by pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and follicle stimulating hormone (FSH). *J. Kedokt. Hewan*, 7(2): 12-16.

Anthony CH, Frank BS. 2018. Glucocorticoids. Doping, Performance-Enhancing Drugs, and Hormones in Sport: Mechanisms of Action and Methods of Detection. Elsevier Ltd., USA.

Diehl R, Ferrara F, Müller C, Dreyer AY, McLeod DD, Fricke S, Boltze J. 2017. Immunosuppression for in vivo research: state-of-the-art protocols and experimental approaches. *Cell. Mol. Immunol.*, 14(2): 146-179.

Dugre FJ, Lambert RD, Belanger A, Fortier MA, Caron S. 1989. Local effect of the rabbit embryo-foetus on uterine progesterone and pregnenolone levels. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 64(2): 251-255.

- Feng R, Sang Q, Zhu Y, Fu W, Liu M, Xu Y. 2015. Mirna-320 in the human follicular fluid is associated with embryo quality in vivo and affects mouse embryonic development in vitro. *Scient. Reports*, 5: 86-89.
- Gholib G, Agil M, Supriatna I, Purwantara B, Heistermann M, Engelhardt A. 2017. Repeated freeze-thaw cycles but not short-term storage of fecal extracts at ambient temperature influence the stability of steroid metabolite levels in crested macaques. *J. Kedokt. Hewan*, 11(2): 78-85.
- Gholib G, Heistermann M, Agil M, Supriatna I, Purwantara B, Nugraha TP, Engelhardt A. 2018. Comparison of fecal preservation and extraction methods for steroid hormone metabolite analysis in wild crested macaques. *Primates*, 59(3): 281-292.
- Gholib G, Pampang FH, Lubis TM, Adam M, Jalaluddin M, Razali R, Karmil TF. 2020. Non-Invasive Measurement of Cortisol Metabolite in Feces of Toraya Buffalo by Using Enzyme Immunoassay Technique. In *E3S Web of Conferences*, (Vol. 151, p. 01061). EDP Sciences.
- Gunasena KT, Lakey JR, Villines PM, Critser ES, Critser JK. 1997. Allogeneic and xenogeneic transplantation of cryopreserved ovarian tissue to athymic mice. *Biol. Reprod.*, 57(2): 226-231.
- Guyton AC, Hall JE. 2007. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. EGC, Jakarta.
- Hafizuddin, Sari WN, Siregar TN, Hamdan. 2011. Persentase berahi dan kebuntingan kambing peranakan ettawa (pe) setelah pemberian beberapa hormon prostaglandin komersial. *J. Kedokt. Hewan*, 5(2): 84-88.
- Ikhsanuddin VM, Nurgiantiningsih A, Kuswati, Mukhtar. 2018. Penampilan produksi sapi aceh umur satu hari, umur sapih, dan umur satu tahun. *J. Ilmu Teknologi Peternakan Tropis.*, 5(3): 67-72.
- Kim SS. 2010. Ovarian tissue transplantation versus whole ovary transplantation. *Reprod. Biomed. Online*. 20: 171-174.
- Melia J, Lefiana D, Siregar TN. 2013. Proses regresi corpus luteum sapi aceh yang disinkronisasi estrus menggunakan prostaglandin F2 alfa (pgf 2 $\alpha$ ). *J. Med. Vet.*, 7(1): 57-60.
- Mohammed AA. 2012. Anesthesia induction and reproductive performance in relation to diazepam and xylazine injection in mice. *Egypt J. Basic Appl. Physiol.*, 11: 1-11.
- Nedic S, Pantelic M, Vranješ-Ouric S, Nedic D, Jovanovic I, Cebulj-Kadunc N, Kobal S, Snoj T, Kirovski D. 2017. Cortisol concentrations in hair, blood and milk of Holstein and Busha cattle. *Slovenian Vet. Res.*, 54(4): 163-72.
- Nugraha TP, Heistermann M, Agil M, Purwantara B, Supriatna I, Gholib G, Weingrill T. 2017. Validation of a field-friendly extraction and storage method to monitor fecal steroid metabolites in wild orangutans. *Primates*, 58(2): 285-294.
- Parkening TA, Collins TJ, Elder FFB. 1985. Orthotopic ovarian transplantations in young and aged C57BL/6J mice. *Biol. Reprod.*, 32(5): 989-997.
- Perry L, Medback S. 2013. *The Immunoassay Handbook : Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. 4th ed. Elsevier Ltd., USA.
- Raynardia YL, Adyatama A, A'yun ZQ, Rosita G, Prawesti LN. 2021. Peran kortisol dalam kasus kawin berulang pada sapi perah peranakan friesland holstein (PFH). *J. Petern Sriwijaya*, 10(2): 39-49.
- Schlegel W, Kruger S, Daniels D, Fischer B, Schneider HPG, Beier HM. 1988. Studies on prostaglandin metabolism in corpora lutea of rabbits during pregnancy and pseudopregnancy. *J. Reprod. Fertil.*, 83: 365-370.
- Siregar TN, Amiruddin, Imshar V, Hamdan, Sayuti A, Armansyah T. 2014. Peningkatan produktivitas sapi aceh melalui implementasi teknologi reproduksi transfer embrio. *J. Ekonomi dan Pembangunan*, 5(1): 12-16.
- Siregar TN, Eldora MK, Melia J, Panjaitan B, Yusmadi, Barus RA. 2012. The presence of a dominant follicle in initiation of superovulation decrease superovulatory response in aceh cattle. *J. Kedokt. Hewan*, 6(2): 67-71.
- Siregar TN, Hamdan H, Riady G, Panjaitan B, Aliza D, Pratiwi EF, Darianto T, Husnurrisal. 2015. Efficacy of two synchronization methods in indonesian aceh cattle. *Int. J. Vet. Sci.*, 4: 87-91.
- Sumarmin R. 2010. Transplantasi ovarium domba intrauterin pada kelinci lokal. *J. Saintek*, 2(1): 40-45.
- Sumarmin R, Winarto A, Yusuf TL, Boediono A. 2008. The development of follicles and oocytes viability from ewe ovarium post-intrauterine transplantation to pseudopregnant rabbit. *J. Vet.*, 9(3): 115-121.
- Sumarmin R, Winarto A, Yusuf TL, Boediono A. 2008. Viabilitas oosit domba pascatransplantasi ovarium domba dalam uterus kelinci pseudopregnant. *Majalah Ilmiah Petern*, 11(1): 25-30.
- Syafruddin S, Wahyuni S, Gholib G, Siregar TN. 2022. Comparison of four methods of inducing pseudopregnancy in rabbits. *Med. Weter.*, 78(2): 85-90.
- Tarmizi NB. 2018. Keberhasilan Inseminasi Buatan (IB) pada sapi aceh menggunakan semen beku sapi bali, simental, dan limosin di kecamatan mesjid raya kabupaten aceh besar. *J. Ilmiah Mahasiswa Vet.*, 2(3): 318-328.

- Von-Borrel EH. 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assesment. *J. Anim. Sci.*, 79: 260-267.
- Washington IM, Van Hoosier G. 2012. Clinical Biochemistry and Hematology. *In* The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents. Academic Press, USA.
- Wennberg L, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, Widner H. 2001. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation*, 71(12): 1797-1806.
- Whirledge S, Cidlowski JA. 2010. Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinologica*, 35(2): 109.
- Yuan P, Huang Y, Cheng B, Zhang J, Xin X. 2010. Induction of a local pseudopregnancy in for the treatment of endometriosis. *Med. Hypotheses*, 7(4): 56-58.