

Pengaruh Agonis GnRH terhadap Rasio Ekspresi Bcl-2/Bax, Perkembangan Folikel dan Folikel Atresia pada Ovarium *Rattus norvegicus* dengan Pemberian Sitostatika Siklofosfamid

Hari Nugroho¹, Brahmana Askandar¹, Hendy Hendaro¹, Widjiati²

¹Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD Dr. Soetomo Surabaya

²Departemen Obstetri Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

ABSTRAK

Kemajuan dalam pengobatan kanker meningkatkan tingkat kelangsungan hidup dengan kemoterapi tetapi kualitas hidup menurun. Kegagalan ovarium prematur (POF) terjadi pada 50% wanita premenopause setelah kemoterapi. Siklofosfamid adalah gonadotoxic, 42-77% wanita premenopause setelah siklofosfamid saja menjadi POF. Penggunaan GnRH agonis dengan kemoterapi menurunkan POF yang diaktifkan oleh reseptor GnRH dalam sel granulosa dan mencegah apoptosis. Tidak ada penelitian tentang GnRH agonis yang digunakan selama kemoterapi dapat menurunkan apoptosis tersebut. Kami menganalisis hubungan GnRH agonis dalam ekspresi rasio apoptosis Bcl-2/Bax dan primer, sekunder, tersier dan folikel atresia untuk mencegah POF posting siklofosfamid di Rattus norvegicus. Penelitian ini menggunakan post test only control group design pada 32 ekor Rattus norvegicus yang dibagi menjadi 2 kelompok, dengan plasebo (P0) dan siklofosfamid dengan GnRH agonis (P1). Swab vagina dilakukan untuk mencapai siklus proestrus. Siklofosfamid diberikan selama 4 hari. GnRH agonis atau plasebo diberikan pada hari pertama setelah pemberian siklofosfamid. Pembedahan dilakukan pada hari kelima. Spesimen Ovarium diwarnai dengan Hematoxylin-Eosin dan imunohistokimia. Bcl-2 ekspresi/Bax pada P1 lebih tinggi dari P0 ($p = 0,017$), jumlah folikel atresia lebih rendah pada P1 ($p = 0,001$). Folikel primer pada P1 lebih tinggi ($p = 0,003$). Folikel sekunder pada P1 lebih rendah ($p = 0,251$) dan folikel tersier pada P1 juga lebih rendah ($p = 0,004$). Penggunaan GnRH agonis dapat menurunkan apoptosis dalam sel granulosa dari Rattus norvegicus yang diberi siklofosfamid. Namun apakah agonis GnRH hanya menekan folikel tertentu, masih menjadi pertanyaan. (MOG 2014;22:112-117)

Kata kunci: GnRH agonist, siklofosfamid, Bcl-2, Bax, apoptosis

ABSTRACT

Advancement in cancer treatment increases the survival rate but chemotherapy decreases the quality of life. Premature ovarian failure (POF) happens in 50% premenopausal women after chemotherapy. Cyclophosphamide is gonadotoxic, 42-77% premenopausal women after cyclophosphamide course become POF. The use of GnRH agonist with chemotherapy decreases the POF by activated GnRH receptor in granulosa cell and prevented apoptosis. There is no research about GnRH agonist used during chemotherapy could decrease the apoptosis. We analyze the relation of GnRH agonist in the apoptosis ratio expression Bcl-2/Bax and primary, secondary, tertiary and follicle atresia to prevent POF post cyclophosphamide in Rattus norvegicus. The randomized post test only control group design research was done in 32 Rattus norvegicus which divided into 2 groups, cyclophosphamide with placebo (P0) and cyclophosphamide with GnRH agonist (P1). Vaginal swab performed to achieve proestrus cycle. Cyclophosphamide was given for 4 days. GnRH agonist or placebo was given at the first day after cyclophosphamide administered. Surgery performed at fifth day. Ovarium specimen stained with Hematoxylin-Eosin and immunohistochemistry. Bcl-2/Bax expression in P1 was higher than P0 ($p=0,017$), follicle atresia count was lower in P1 ($p=0,001$). Primary follicle in P1 was higher ($p=0,003$). But the secondary and tertiary follicle were not matched with the hypothesis, secondary follicle in P1 was lower ($p=0,251$) and tertiary follicle P1 was lower ($p=0,004$). The use of GnRH agonist could decrease the apoptosis in granulosa cell of Rattus norvegicus exposed with cyclophosphamide. But did GnRH agonist only suppress certain follicle still remain a question. (MOG 2014;22:112-117)

Keywords: GnRH agonist, cyclophosphamide, Bcl-2, Bax, apoptosis

Correspondence: Hari Nugroho, Departemen Obstetri dan Ginekologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, RSUD dr. Soetomo, Surabaya, email: harinugroho@gmail.com

PENDAHULUAN

Kemajuan terapi kanker meningkatkan angka kehidupan penderita kanker sedangkan kemoterapi menurunkan kualitas hidup penderita kanker.¹ Sekitar 50% wanita

usia subur mendapatkan kemoterapi akan mengalami kegagalan ovarium dini (KOD) dan penyebab KOD terbesar adalah agen alkil seperti siklofosfamid.² Walaupun Cochrane Review telah menyebutkan bahwa penggunaan agonis GnRH secara bermakna dapat

melakukan proteksi ovarium pada wanita usia subur, mekanisme pasti terjadinya gonadoproteksi belum jelas.³ Hingga saat ini beberapa penelitian telah dilakukan dan diduga kuat kemungkinan dari 5 mekanisme, yaitu: penekanan sekresi follicle stimulating hormone (FSH), menurunnya perfusi utero-ovarium, aktivasi reseptor GnRH, peningkatan peran sphingosine-1-phosphate dan proteksi sel stem germinal. Peran aktivasi reseptor GnRH hingga saat ini belum diteliti lebih lanjut dan masih memberikan pertanyaan besar mengenai hipotesis Gründker dan Emons bahwa terdapat reseptor GnRH pada sel granulosa dan aktivasi reseptor tersebut dapat menurunkan apoptosis melalui aktivasi nucleus factor kappa B (NFκB).^{4,5,6}

Kemoterapi menyerang seluruh sel yang sedang berproliferasi, termasuk sel granulosa yang aktif berproliferasi pada proses folikulogenesis.⁷ Kemoterapi yang diberikan pada wanita usia subur mengakibatkan berkurangnya jumlah oosit dan mempengaruhi baik struktur maupun fungsi dari oosit dan sel granulosa pada dosis dan jenis obat tertentu. Siklofosfamid dilaporkan sebagai obat paling gonadotoksik yang menyebabkan apoptosis sel granulosa melalui peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS).⁸ Apoptosis pada sel granulosa akan menyebabkan folikel atresia dan folikel atresia dapat terjadi pada tahapan folikel manapun pada proses folikulogenesis.⁹

Bcl-2 merupakan protein anti-apoptosis sedangkan Bax merupakan protein proapoptosis. Rasio dari Bcl-2 dan Bax merupakan titik penting untuk melihat apakah proses apoptosis akan terjadi atau tidak. Bahkan rasio dari Bcl-2 dan Bax merupakan titik penentu terjadinya apoptosis.^{10,11}

Dengan melakukan penelitian untuk melihat rasio ekspresi Bcl-2/Bax pada ovarium dan penghitungan jumlah folikel ovarium pada perlakuan dengan GnRH agonis pada terapi sitostatika siklofosfamid diharapkan akan dapat membuktikan teori anti apoptosis dari agonis GnRH pada tingkat selular.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium pada hewan coba dengan *randomized post test only control group design*. Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2013 di Laboratorium Hewan Percobaan dan Laboratorium Patologi Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Sampel penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) dengan kriteria inklusi: subur, berusia 3 bulan dengan

berat antara 100-200g, belum pernah kawin dan sehat ditandai dengan bulu halus, mata bersinar, tidak pincang dan tidak didapatkan bekas luka. Kriteria eksklusi: pernah dipakai sebagai hewan coba penelitian lain atau cacat. Sampel dilakukan swab vagina setiap hari untuk menentukan fase proestrus dan memastikan bahwa hewan coba sudah subur.¹² Pada fase proestrus diberikan suntikan siklofosfamid 20 mg/kgBB/hari intraperitoneal (IP).¹³ Sampel penelitian dibagi menjadi dua kelompok tikus coba, yaitu kelompok P0 mendapat suntikan plasebo dan kelompok P1 mendapat suntikan leuprolide asetat depot 3 mg/kgBB subcutan (SC).¹⁴ Penyuntikan perlakuan diberikan satu kali segera setelah pemberian siklofosfamid hari pertama. Selanjutnya kedua kelompok dilanjutkan pemberian suntikan siklofosfamid pada hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4, dan dilakukan pembedahan ovarium pada hari ke-5.

Ovarium dilakukan pemotongan dengan mikrotom kemudian diletakkan pada gelas obyek. Dilakukan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE), pengecatan imunohistokimia dengan menggunakan Rabbit Anti-Phospho-Bcl2 (Ser87) Polyclonal Antibody merek Bioss (nomor batch bs-12577R) dan pengecatan imunohistokimia dengan menggunakan *Mouse Anti-Bax Polyclonal Antibody* merek Bioss (nomor batch bs-0127M). Hasil pengecatan HE dilihat di bawah mikroskop untuk menghitung jumlah rerata folikel atresia, folikel primer, folikel sekunder dan folikel tersier. Hasil pengecatan imunohistokimia dinilai secara *Immunoreactive Score* (IRS) menggunakan metode Remmele modifikasi.¹⁵

Variabel yang diuji adalah berat badan, jumlah rerata folikel atresia, folikel primer, folikel sekunder, folikel tersier, ekspresi Bcl-2, ekspresi Bax dan rasio ekspresi Bcl-2/Bax. Data penelitian ini dicatat dalam formulir pengambilan data yang dirancang khusus untuk penelitian ini. Analisa data menggunakan software self propelled semi submersible (SPSS).

Dilakukan pengujian jumlah folikel dan ekspresi Bcl-2/Bax pada kelompok P0 dan P1. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk. Bila data berdistribusi normal dilanjutkan dengan uji t-tidak berpasangan. Bila data tidak berdistribusi normal akan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Tingkat kemaknaan yang dipergunakan dalam penelitian ini sebesar 0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tidak didapatkan perbedaan bermakna pada perhitungan perbedaan berat badan antara kelompok P0 dan P1 ($p=0,217$), berarti variabel berat badan dapat kita

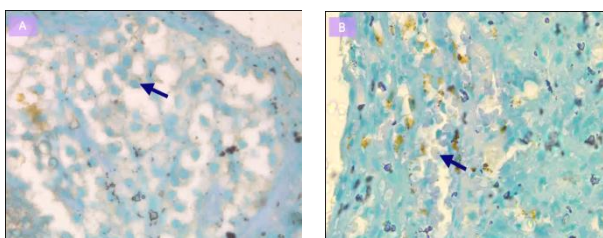
singkirkan sebagai bias pada penelitian ini. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan berat badan antar kelompok

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	150	130	0.217
2	160	140	
3	120	180	
4	130	170	
5	160	160	
6	100	130	
7	110	150	
8	140	150	
9	140	130	
10	180	180	
11	200	140	
12	120	170	
13	130	150	
14	140	140	
15	170	160	
16	120	150	
MEAN	141.88	151.88	

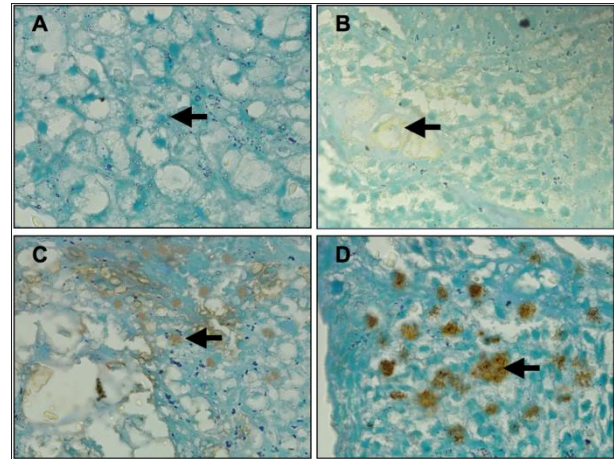
Tabel 2. Perbedaan ekspresi Bcl-2 antar kelompok

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	0	2	0,006
2	0	2	
3	1	3	
4	0	6	
5	1	3	
6	3	0	
7	0	1	
8	1	2	
9	4	1	
10	1	3	
11	2	3	
12	2	2	
13	1	3	
14	1	1	
15	0	3	
16	0	3	
MEAN±SD	1,06±1,18	2,38±1,36	



Gambar 1. Perbandingan ekspresi Bcl-2 (panah) antara kelompok P0 (slide A) dengan kelompok P1 (slide B). Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa ekspresi Bcl-2 pada kelompok P0 diketahui lebih lemah di-

bandingkan P1 (pewarnaan immunohistokimia, pembesaran 1000x).



Gambar 2. Slide A menunjukkan ekspresi Bax negatif dimana sel nampak berwarna hijau kebiruan (panah), sedangkan slide B, C dan D merupakan sel-sel immunoreaktif positif, dengan ekspresi yang berbeda. Slide B mewakili sel dengan ekspresi lemah, yang ditunjukkan oleh intensitas warna kekuningan (panah). Slide C mewakili sel dengan ekspresi sedang, yang ditunjukkan oleh intensitas warna coklat muda (panah), sedangkan slide D mewakili sel dengan ekspresi kuat yang ditunjukkan oleh warna coklat tua (panah). Hasil penelitian ini, menunjukkan bahwa ekspresi Bax pada kelompok P0 diketahui lebih kuat dibandingkan P1. (pewarnaan immunohistokimia, pembesaran 1000x).

Sampai saat ini mekanisme terjadinya proteksi ovarium menggunakan agonis GnRH pada pemberian kemo-terapi terbukti sebatas terjadinya penurunan FSH untuk menurunkan folikulogenesis dan penurunan perfusi darah ke ovarium. Penekanan folikulogenesis ini mengakibatkan folikel tidak tumbuh, folikel tidak tumbuh lebih aman terhadap paparan siklofosamid. Penurunan perfusi darah menuju ovarium akibat rendahnya kadar estrogen dalam darah akibat penekanan folikulogenesis. Hipotesis terjadinya penurunan apoptosis melalui mekanisme reseptor GnRH pada permukaan sel granulosa belum terbukti.^{10,11} Dari perhitungan rerata ekspresi Bcl-2 didapatkan hasil kelompok P1 lebih tinggi dibanding kelompok P0 (p=0,006) secara bermakna. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis, dimana kelompok dengan pemberian agonis GnRH (P1)

didapatkan kejadian apoptosis lebih rendah dibanding tanpa agonis GnRH (P0).

Dari perhitungan rerata ekspresi Bax didapatkan hasil kelompok P1 lebih rendah dibanding kelompok P0 ($p=0,004$) secara bermakna. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis, dimana kelompok dengan pemberian agonis GnRH (P1) didapatkan kejadian apoptosis lebih rendah dibanding tanpa agonis GnRH (P0). Dari perhitungan rerata rasio ekspresi Bcl-2/Bax didapatkan hasil kelompok P1 lebih tinggi dibanding kelompok P0 ($p=0,017$) secara bermakna. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis, dimana kelompok dengan pemberian agonis GnRH (P1) didapatkan kejadian apoptosis lebih rendah dibanding tanpa agonis GnRH (P0).

Perbedaan Bcl-2/Bax ini menunjukkan lebih rendahnya kejadian apoptosis pada pemberian agonis GnRH. Lebih rendahnya apoptosis pada kelompok P1 menunjukkan bahwa reseptor GnRH pada permukaan sel granulosa apabila berikatan dengan agonis GnRH dapat melawan sinyal apoptosis melalui mekanisme peningkatan ROS pada sitoplasma sel granulosa akibat pemberian siklofosamid. Rendahnya kejadian apoptosis pada kelompok P1 dikonfirmasi secara histologi melalui penghitungan jumlah folikel atresia. Dari penelitian ini didapatkan jumlah folikel atresia pada kelompok P1 lebih rendah dibanding kelompok P0, yaitu $16,94 \pm 7,84$ dibanding $31,81 \pm 7,02$ dengan nilai $p=0,001$. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 3. Secara imunohistokimia tidak dapat kita telusuri apakah ekspresi Bcl-2 dan Bax tersebut murni berasal dari sel granulosa dan sel lain tidak mengekspresikan protein tersebut. Tetapi secara histologi dapat kita konfirmasi bahwa rasio ekspresi Bcl-2/Bax berbanding terbalik terhadap jumlah folikel atresia secara histologi pada kedua kelompok.

Hasil penelitian ini dapat menjawab pertanyaan penelitian sebelumnya mengenai peranan agonis GnRH pada reseptor GnRH di sel granulosa. Agonis GnRH dapat menekan terjadinya apoptosis melalui mekanisme ikatan agonis GnRH dengan reseptor GnRH pada permukaan sel granulosa. Ikatan tersebut akan menghambat sinyal apoptosis dari peningkatan ROS pada sel granulosa akibat paparan siklofosamid. Kejadian apoptosis pada sel granulosa dapat terjadi pada semua tahapan folikulogenesis, mulai folikel primordial, folikel primer, folikel sekunder dan folikel tersier [9]. Dari penelitian ini didapatkan hasil perhitungan rerata folikel primer pada kelompok P0 lebih rendah dibanding P1 secara bermakna dengan nilai $3,25 \pm 4,07$ dibanding $5,19 \pm 2,69$ ($P=0,003$). Hasil ini sesuai dengan hipotesis dimana apoptosis pada kelompok kontrol lebih tinggi, sehingga

folikel yang ada lebih rendah akibat banyak folikel menjadi atresia akibat apoptosis sel granulosa.

Tabel 3. Perbedaan ekspresi Bax antar kelompok

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	1	2	0,004
2	1	0	
3	1	1	
4	1	0	
5	2	1	
6	6	1	
7	3	3	
8	3	2	
9	2	1	
10	3	2	
11	3	1	
12	1	2	
13	1	0	
14	3	0	
15	6	0	
16	3	0	
MEAN±SD	2,5±1,63	1±0,97	

Tabel 4. Perbedaan rasio ekspresi Bcl-2/Bax antar kelompok

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	0,00	1,00	0,017
2	0,00	-	
3	1,00	3,00	
4	0,00	-	
5	0,50	3,00	
6	0,50	0,00	
7	0,00	0,33	
8	0,33	1,00	
9	2,00	1,00	
10	0,33	1,50	
11	0,67	3,00	
12	2,00	1,00	
13	1,00	-	
14	0,33	-	
15	0,00	-	
16	0,00	1,00	
MEAN±SD	0,54±0,66	1,48±1,12	

Tabel 5. Perbedaan rerata folikel atresia antar kelompok

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	41	16	0,001
2	30	14	
3	28	11	
4	20	8	
5	32	14	
6	30	15	
7	22	23	
8	26	11	
9	41	22	
10	39	21	
11	37	9	
12	27	10	
13	27	12	
14	44	28	
15	34	37	
16	31	20	
MEAN±SD	31,81±7,02	16,94±7,84	

Tabel 6. Rerata jumlah folikel primer antar kelompok

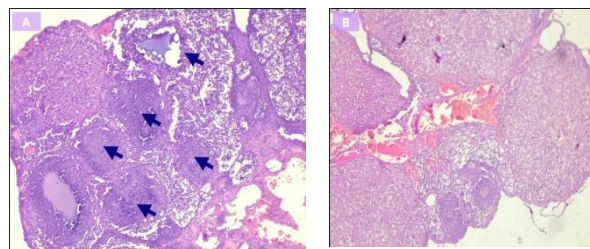
SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	3	3	0,03
2	0	5	
3	0	2	
4	2	5	
5	0	3	
6	3	8	
7	5	7	
8	0	3	
9	8	11	
10	2	5	
11	5	7	
12	15	2	
13	7	9	
14	0	5	
15	2	6	
16	0	2	
MEAN±SD	3,25±4,07	5,19±2,69	

Tabel 7. Rerata jumlah folikel sekunder antar kelompok sampel

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	0	0	0,251
2	1	2	
3	5	2	
4	6	0	
5	7	2	
6	5	1	
7	5	0	
8	6	2	
9	6	8	
10	5	2	
11	0	5	
12	0	4	
13	3	0	
14	3	1	
15	0	2	
16	1	5	
MEAN±SD	3,31±2,60	2,25±2,24	

Tabel 8. Rerata jumlah folikel sekunder antar kelompok sampel

SAMPSEL	KELOMPOK		HARGA p
	P0	P1	
1	0	0	0,004
2	0	0	
3	1	0	
4	0	0	
5	1	0	
6	9	0	
7	0	1	
8	2	0	
9	2	0	
10	4	0	
11	2	0	
12	3	1	
13	2	0	
14	0	1	
15	0	0	
16	9	0	
MEAN±SD	2,19±2,93	0,19±0,40	



Gambar 3. Perbedaan gambaran histologi ovarium antara kelompok P0 (slide A) kelompok P1 (slide B). Secara umum nampak bahwa jumlah folikel atretik (panah) pada kelompok P0 lebih menonjol dibandingkan kelompok P1 (pewarnaan HE; pembesaran 100x).

Dari perhitungan jumlah rerata folikel sekunder didapatkan hasil kelompok P1 lebih rendah dibanding kelompok P0 ($p = 0,251$) secara tidak bermakna. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 7. Perhitungan jumlah rerata folikel tersier didapatkan hasil kelompok P1 lebih rendah dibanding kelompok P0 ($p = 0,004$) secara bermakna. Hal ini dapat dilihat pada Tabel 8. Hasil ini tidak sesuai dengan hipotesis dimana apoptosis pada kelompok kontrol lebih tinggi, sehingga seharusnya perhitungan rerata folikel sekunder dan tersier lebih tinggi pada kelompok P1 dibanding kelompok P0. Perbedaan hasil penelitian ini dibanding hipotesis memunculkan pertanyaan baru.

Apakah peran penekanan apoptosis dari reseptor GnRH pada permukaan sel granulosa hanya terjadi pada fase folikular tertentu? Kelemahan dari penelitian ini adalah tidak mampunya meneliti apakah ekspresi Bcl-2 dan Bax terjadi pada fase folikel tertentu. Perhitungan rerata ekspresi Bcl-2 dan Bax menurut metode Remmele modifikasi hanya menentukan Immunoreactive Score (IRS) melalui perkalian dari skor jumlah sel positif dengan skor intensitas warna. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah penekanan apoptosis melalui mekanisme ikatan reseptor GnRH dengan agonis GnRH pada sel granulosa terjadi pada fase folikular tertentu.

Apakah ketidaksesuaian ini berkaitan dengan perbedaan jumlah rerata folikel pada kelompok P0 dan P1 akibat tingginya kadar plasma FSH pada kelompok P1 akibat mekanisme *flare up* akibat pemberian agonis GnRH pada pituitari atau bahkan kadar FSH lebih tinggi pada kelompok P0 akibat mekanisme umpan balik positif ke hipotalamus akibat rusaknya folikel? Kelemahan pada penelitian ini adalah tidak diperiksanya kadar FSH pada kedua kelompok dan penelitian hanya dibagi menjadi 2 kelompok. Apabila diperiksakan kadar FSH maka dapat

kita ketahui perbedaan kadar FSH yang membuat penelitian ini bias. Apabila penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, maka dapat diketahui perbedaan FSH dan jumlah rerata folikel pada *Rattus norvegicus* normal, pemberian siklofosamid, pemberian agonis GnRH dan pemberian siklofosamid bersamaan dengan agonis GnRH. Kelemahan ini membuka peluang untuk penelitian lanjutan untuk menjawab pertanyaan diatas.

SIMPULAN

Pemberian agonis GnRH menurunkan kejadian apoptosis pada sel granulosa *Rattus norvegicus* dengan paparan siklofosamid, dibuktikan dengan rendahnya jumlah folikel atresia. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui mekanisme lebih mendalam penurunan apoptosis ini.

Lebih rendahnya jumlah folikel sekunder dan folikel tersier pada penggunaan agonis GnRH dibanding tanpa agonis GnRH perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah penekanan apoptosis melalui mekanisme ikatan reseptor GnRH dengan agonis GnRH pada sel granulosa terjadi pada fase folikular tertentu.

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui kadar FSH dan jumlah rerata folikel dengan 4 kelompok yang berbeda, yaitu *Rattus norvegicus* normal, pemberian siklofosamid, pemberian agonis GnRH dan pemberian siklofosamid bersamaan dengan agonis GnRH.

DAFTAR PUSTAKA

1. Imai T and Furui T. Chemotherapy-Induced Female Infertility and Protective Action of Gonadotropin-Releasing Hormone Analogues. *Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2007;27(1):20-4.
2. Falorio S. et al. Gonadotropin-Releasing Hormone Analog Treatment for The Prevention of Treatment-Related Ovarian Failure and Infertility in Women of Reproductive Age with Hodgkin Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 2008;49(6): 1087-109.
3. Chen, Hengxi et al. Adjuvant gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy induced premature ovarian failure in premenopausal women. *West China Second University Hospital. West China Women's and Children's Hospital. China: Sichuan*; 2011.
4. Blumenfeld Z. How to Preserve Fertility in Young Women Exposed to Chemotherapy? The Role of GnRH Agonist Cotreatment in Addition to Cryopreservation of Embrya, Oocytes, or Ovaries. *The Oncologist*. 2007;12:1044-54.
5. Blumenfeld Z and Haim N. Prevention of Gonadal Damage during Cytotoxic Therapy. *Endocrinology and Infertility Section*. 1997.
6. Gründker C and Emons G. Rule of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in Ovarian Cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003;1: 65.
7. Yap JKW and Davies M. Fertility Preservation in Female Cancer Survivors. *Journals of Obstetrics and Gynecology*. 2007;27(4):390-400.
8. Tsai-Turton, Miyun et al. Cyclophosphamide-Induced Apoptosis in COV434 Human Granulosa Cells Involves Oxidative Stress and Glutathione Depletion. *Toxicological Sciences*. 2007;98(1):216-30.
9. Inoue, Noriyuki et al. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J Reprod Dev*. 2011;57(2):169-75.
10. Gross, Atan et al. BCL-2 Family Members and The Mitochondria In Apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13: 1899-191.
11. Wong, Rebecca SY. Apoptosis In Cancer: From Pathogenesis To Treatment. *Division of Human Biology. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2001.
12. Turner C and Bagnara JT. *Endokrinologi Umum*. Edisi 6. Alih Bahasa Harsojo. Surabaya: Airlangga University Press;1998. h. 449-498.
13. Huang, Yan-hong et al. The GnRH Antagonist Reduces Chemotherapy-Induced Ovarian Damage in Rats by Suppressing the Apoptosis. *China: Xi'an*; 2008.
14. Okada, Hiroaki. One- and Three-Month Release Injectable Microsphere of the LH-RH Superagonist Leuprolin Acetate. *Pharmaceutical Business Development. Japan: Osaka*; 1997;28:43-70.
15. Novak M, Madej JA and Dziegeil P. Intensity of Cox 2 expression in Cell of Soft Tissue Fibrosarcomas in Dog As Related to Grade of Tumor malignation. *Bull Vet inst Pulawy*. 2007;51:275-9.