

KUALITAS OOSIT DARI OVARIUM SAPI PERANAKAN ONGOLE (PO) PADA FASE FOLIKULER DAN LUTEAL

THE QUALITY OF OOCYTES FROM OVARIES OF ONGOLE CROSSBREED ON FOLLICULAR AND LUTEAL PHASES

R Handarini^{1a}, D Sudrajat¹, dan D Hardiansyah²

¹Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Djuanda Bogor, Jl. Tol Ciawi No.1 Kotak Pos 35 Bogor 16720

²Balai Embrio Transfer Cipelang, Bogor

^aKorespondensi: Ristika Handarini, Email: ristika.handarini@unida.ac.id
(Diterima: 05-08-2014; Ditelaah: 09-08-2014; Disetujui: 18-08-2014)

ABSTRACT

The ovary is an abattoir waste, which still can be used as a carrier of genetic material for *in vitro* fertilization. The aim of this study was compared the quality of oocytes produced by ovarian follicles from ongole crossbreed in the follicular and luteal phases. Ovaries of ongole crossbreed obtained from Depok slaughter houses each 5 pairs of follicular phase and 5 pairs of the luteal phase. Ovarian transport medium using lactate ringer and antibiotics (0,1%) at a temperature 38,5°C. Aspiration and classification of oocyte quality was evaluated in Laboratory Production of Balai Embrio Ternak Cipelang Bogor. Oocyte was aspirated using 18G needles in phosphate buffer saline medium, 3% calf serum, and 1% antibiotics. The oocyte quality (grade A, B, C, and D) were evaluated using a stereo microscope. Data were tabulated and analyzed using Chi Square to test for differences in oocyte quality in both phases: follicular and luteal. The results showed significant differences ($P < 0,5$) at grade A and grade B, while C and D showed no significant difference ($P > 0,5$), which was higher in the luteal phase. Total mean grade (A and B) were used for *in vitro* fertilization showed significant differences ($P < 0,5$) in the luteal phase. The conclusions showed that the quantity and quality of grade A and B oocytes is higher in the luteal phase.

Key words: quality of oocytes, ovarian abattoir waste, luteal phase, follicular phase, ongole crossbred.

ABSTRAK

Ovarium merupakan limbah rumah potong hewan (RPH) yang masih mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai pembawa materi genetik untuk proses fertilisasi *in vitro*. Penelitian ini bertujuan membandingkan kualitas oosit yang dihasilkan oleh folikel dari ovarium sapi peranakan ongole (PO) pada fase folikuler dan luteal. Ovarium sapi PO diperoleh dari RPH Depok masing-masing 5 pasang (fase folikuler) dan 5 pasang fase luteal. Medium transportasi ovarium menggunakan laktat ringer dan antibiotik (0,1%) pada suhu 38,5°C. Aspirasi dan klasifikasi kualitas oosit dilakukan di Laboratorium Produksi Embrio Balai Embrio Ternak Cipelang Bogor. Aspirasi oosit menggunakan jarum suntik 18 G dalam medium *phosphat buffer saline*, *calf serum* 3%, dan antibiotik 1%. Pengamatan kualitas oosit (grade A, B, C, dan D) menggunakan mikroskop stereo. Data ditabulasi dan dianalisis dengan Chi Square untuk menguji perbedaan kualitas oosit pada kedua fase: folikuler dan luteal. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan nyata ($P < 0,5$) pada grade A dan B, sedangkan grade C dan D tidak menunjukkan beda nyata ($P > 0,5$) lebih tinggi pada fase luteal. Total rata-rata grade (A dan B) digunakan untuk proses fertilisasi menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,5$) pada fase luteal. Dapat disimpulkan bahwa produksi dan kualitas oosit grade A dan B dari oosit lebih banyak pada fase luteal.

Kata kunci: kualitas oosit, ovarium limbah RPH, fase luteal, fase folikuler, sapi PO.

PENDAHULUAN

Embrio transfer merupakan tingkatan bioteknologi reproduksi generasi kedua setelah inseminasi buatan (IB). Transfer embrio merupakan teknologi pemindahan embrio dari hasil fertilisasi *in vitro* maupun *in vivo*. Fertilisasi adalah suatu proses yang kompleks dimana terjadi pengabungan dua gamet, perubahan jumlah kromosom somatik (n menjadi $2n$), dan awal dari pertumbuhan individu baru (Gordon 1994). Hafez dan Hafez (2000) mendefinisikan fertilisasi sebagai penyatuan materi DNA paternal dan maternal pada embrio. Fertilisasi merupakan tahap penting dalam proses reproduksi pada tahap awal pemuahan. Protein yang berarosiasi pada sperma berinteraksi dengan zona pelucida oosit dan kemudian terjadi proses reaksi akrosom dan penetrasi sperma pada sel telur (Sun dan Nagai 2003).

Morfologi yang ideal dari oosit setelah dimaturasi secara *in vitro* adalah mempunyai sel-sel kumulus yang melebar dan cerah. Fungsi sel kumulus sangat penting pada proses maturasi sel telur secara *in vitro* yaitu untuk menginduksi reaksi akrosom sperma dan fertilisasi serta perkembangan oosit selanjutnya. Sel telur tanpa kumulus, setelah proses maturasi akan banyak kehilangan protein, sedangkan pada sel telur dengan sel kumulus intact protein akan tertahan. Penghilangan sel-sel kumulus pada awal maturasi *in vitro* akan menurunkan potensi perkembangan oosit (Maedomari *et al.* 2007; Gustari *et al.* 2009). Sel-sel kumulus mengelilingi oosit pada saat perkembangan folikuler dan ovulasi serta memberikan peranan penting dalam mengontrol perkembangan oosit, proses maturasi, fertilisasi, dan perkembangan embrionik selanjutnya (Tanghe *et al.* 2002; Gandolfi *et al.* 1997).

Penentuan kualitas oosit dapat dilakukan dengan beberapa metode untuk memilih oosit yang akan digunakan pada proses FIV. Metode seleksi oosit yang banyak digunakan adalah pemilihan oosit berdasarkan morfologi sel kumulus yang berada disekitar oosit (Lonergan *et al.* 1994; Alvarez *et al.* 2009). Teknik *grading* merupakan cara yang lebih mudah dan objektif untuk mengevaluasi sel-sel kumulus oosit yang komplek. Keberadaan sel kumulus mendukung pematangan oosit sampai pada tahap metaphase II dan pematangan sitoplasma yang diperlukan untuk kemampuan perkembangan setelah fertilisasi (Abeydeera 2002). Oosit dengan kumulus yang multilayer digunakan dalam produksi embrio secara *in vitro* (Qian *et al.* 2005).

Menurut Gordon (2003), kriteria pemilihan oosit yang berkualitas baik dapat dilihat dari bagian ooplasma yang homogen, sel kumulus yang kompak mengelilingi zona pelucida.

Oosit yang dikoleksi dikategorikan menjadi 4 grade berdasarkan kualitasnya: grade A adalah oosit yang memiliki kumulus yang seragam dan kompak dengan dikelilingi oleh lima lapisan atau lebih sel kumulus. Oosit dengan grade B adalah oosit yang memiliki sitoplasma yang gelap dengan komplemen dari korona radiata yang lengkap tetapi dikelilingi tidak lebih dari lima lapis sel kumulus. Oosit dengan grade C adalah oosit yang ditandai dengan oosit yang kurang seragam dan warna sitoplasma lebih transparan dan tidak merata serta terlihat tidak kompak. Oosit dengan kategori D mempunyai sitoplasma yang transparan bahkan terdapat fragmentasi pada sitoplasma. Sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit terlihat sangat jarang dan bahkan beberapa oosit tidak memiliki sel kumulus.

Saat ini, pemotongan sapi betina produktif banyak dilakukan di pemotongan hewan milik masyarakat. Hal tersebut dapat menguras populasi sapi betina produktif sehingga populasinya akan terus berkurang. Pemerintah telah mencanangkan penyelamatan sapi betina produktif untuk menanggulangi pemotongan sapi betina produktif tersebut. Penyelamatan sapi betina produktif tersebut bertujuan untuk menjamin kelangsungan hidup keturunan sapi tersebut, sehingga diharapkan populasi sapi dapat terus meningkat. Ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH) sesaat setelah pemotongan dapat dimanfaatkan sebagai sumber oosit untuk keperluan *in vitro* maturasi sehingga dapat memudahkan *in vitro* fertilisasi (Pujol *et al.* 2004). Namun, keberhasilan *in vitro* fertilisasi sampai ke tahap blastosist sangat tergantung pada suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro* (Hammam *et al.* 2010).

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan perbedaan kualitas oosit yang dihasilkan oleh folikel dari ovarium sapi peranakan ongole (PO) pada fase folikuler dan luteal. Hipotesis yang diajukan adalah terdapat perbedaan kualitas dan jumlah oosit yang dihasilkan oleh ovarium sapi PO pada fase folikuler dan luteal.

MATERI DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2014 sampai dengan bulan Februari 2014. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Produksi Embrio Balai Embrio Ternak Cipelang Bogor. Lokasi pengambilan ovarium di RPH Sawangan Depok.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: 5 pasang ovarium sapi PO fase luteal, 5 pasang ovarium fase folikuler dari RPH. Media yang digunakan antara lain: laktat ringer 500 ml (widatra), PBS (phosphate buffer saline, sigma), FCS (fetal calf serum, sigma cat. F 2442), antibiotik (pennisilin, sigma cat. 4687 dan streptomisin, sigma cat. S 1277).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: mikroskop (nikkon) stereo (untuk mengamati oosit), pipete pasteur dan selang silikon digunakan untuk memindahkan oosit, termos sebagai tempat transportasi ovarium dari RPH ke laboratorium, *hot plate* digunakan untuk menjaga suhu media dan ovarium, *beaker glass* digunakan untuk menyimpan ovarium, cawan petri 90x100 mm untuk menyimpan oosit yang telah diaspirasi, cawan petri 35x10 mm untuk tempat menyimpan oosit yang sudah diklasifikasikan menurut grade atau kualitasnya (A, B, C, dan D), *water bath* digunakan untuk menghangatkan bahan dan media, *clean bench* sebagai tempat untuk membuat bahan media yang digunakan dalam penelitian ini, jarum suntik 18 G dan spuit 5 ml digunakan untuk mengaspirasi oosit, pinset digunakan untuk mengambil ovarium yang akan diaspirasi, gunting *stainless* digunakan untuk membersihkan ovarium dari organ-organ yang masih melekat, mikrofilter 0,22 μ l digunakan untuk menyaring media untuk aspirasi oosit.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Media Transportasi dan Koleksi Oosit

Media yang digunakan untuk transportasi ovarium adalah larutan laktat ringer yang tambahkan antibiotik sebanyak 0,1% disimpan dalam termos pada suhu media 38,5°C (Kisher *et al.* 2007; Takagi *et al.* 1993). Media koleksi oosit yang digunakan adalah PBS yang ditambahkan *calf serum* 3% dan antibiotik 1%. Media

disterilisasi dengan cara disaring menggunakan mikrofilter 0,22 μ L dan media dihangatkan pada suhu 38,5°C dengan menggunakan *water bath*.

Teknik Koleksi Oosit

Selama persiapan, ovarium dan media diletakkan dalam *hot plate* untuk menjaga kestabilan suhu. Ovarium dibersihkan dan dikeringkan dengan kertas tisu steril, kemudian oosit dari folikel yang berukuran 2–6 mm diaspirasi menggunakan *syring* 5 ml dan jarum suntik 18 G yang berisi larutan PBS dan *fetal calf serum* 3% dengan tekanan 40 mmHg (Sumantri dan Anggraeni 1999; Ubarak *et al.* 2001). Oosit dikumpulkan dalam cawan petri (90x100 mm) dilakukan *grading* oosit menurut metode Yoon *et al.* (2001). Oosit dipindahkan ke dalam cawan petri berdiameter 35 x 10 mm sesuai grade-nya: A, B, C, dan D.

Parameter Penelitian

- Oosit Grade A memiliki kumulus yang seragam dan kompak dengan dikelilingi oleh lima lapisan atau lebih sel kumulus. Persentase oosit grade A diperoleh dari perbandingan oosit grade A dengan total oosit yang diperoleh dikali 100 persen.
- Oosit Grade B ditandai dengan oosit seragam dan memiliki sitoplasma yang gelap dengan komplemen dari korona radiata yang lengkap tetapi dikelilingi tidak lebih dari lima lapis sel kumulus. Persentase oosit grade B diperoleh dari perbandingan oosit grade B dengan total oosit yang diperoleh dikali 100 persen.
- Oosit Grade C ditandai dengan oosit yang kurang seragam dan warna sitoplasma lebih transparan, tidak merata, dan terlihat tidak kompak. Persentase oosit grade C diperoleh dari perbandingan oosit grade C dengan total oosit yang diperoleh dikali 100 persen.
- Oosit Grade D mempunyai sitoplasma yang transparan bahkan terdapat fragmentasi pada sitoplasma. Sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit terlihat sangat jarang dan bahkan beberapa oosit tidak memiliki sel kumulus. Persentase oosit grade D diperoleh dari perbandingan oosit grade D dengan total oosit yang diperoleh dikali 100 persen.

Analisis Data

Hasil penelitian berupa data jumlah kualitas oosit yang terkoleksi pada ovarium fase folikuler dan luteal. Menurut Gaspersz (1991) dinyatakan dengan istilah uji Khi-kuadrat (Chi-square test).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah dan Kualitas Oosit pada Fase Folikuler dan Fase Luteal

Oosit yang dikoleksi dikelompokkan sesuai dengan gradenya yaitu grade: A, B, C, dan D. Hasil analisis *Chi Kuadrat* disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa kualitas oosit grade A nyata ($P<0,05$) lebih banyak diperoleh pada

fase luteal 104 ($20,8\pm 12,52$), sementara grade C nyata ($P<0,05$) lebih tinggi pada fase folikuler 63 ($32,06\pm 14,38$). Total jumlah oosit nyata lebih tinggi pada fase luteal dibandingkan fase folikuler. Beberapa penelitian memberikan dukungan terhadap hasil penelitian ini yang menyatakan bahwa oosit yang dikoleksi dari ovarium pada fase luteal mampu berkembang lebih baik dibandingkan oosit yang diperoleh pada fase folikuler.

Tabel 1. Hasil analisis *chi kuadrat*

Fase	Kualitas oosit grade (%)				Jumlah Oosit
	A	B	C	D	
Folikuler					
Jumlah (rata-rata \pm SD)	42 ($8,4\pm 3,36$) ^a	63 ($32,06\pm 14,38$) ^b	37 ($7,4\pm 3,21$)	33 ($6,6\pm 3,78$)	175
Persentase (rata-rata \pm SD)	27,9 \pm 13,9	27,2 \pm 19,8	22,3 \pm 5,4	17,69 \pm 7,23	
Luteal					
Jumlah (rata-rata \pm SD)	104 ($20,8\pm 12,52$) ^b	47 ($9,40\pm 6,95$) ^a	47 ($9,40\pm 3,78$)	60 ($12,0\pm 9,08$)	258
Persentase (rata-rata \pm SD)	39,65 \pm 10,44	17,26 \pm 6,03	21,30 \pm 13,73	21,86 \pm 10,81	

Keterangan: Superskrip yang sama pada satu kolom menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$).

Pada fase luteal dengan adanya korpus luteum akan menghasilkan oosit yang matang lebih banyak karena adanya sekresi hormon progesteron yang dapat menghambat sekresi FSH dan LH sehingga oosit mengalami pematangan yang optimum. Menurut Boediono *et al.* (1999), keberadaan korpus luteum akan memberikan korelasi positif terhadap jumlah folikel dalam menghasilkan oosit. Menurut Solihati *et al.* (2006), jumlah dan kualitas oosit yang terbanyak

diperoleh dari oosit grade A dan disusul oleh oosit grade B pada fase luteal.

Oosit yang Dapat Digunakan dalam Proses Fertilisasi *In Vitro*

Perbedaan produksi oosit dari ovarium limbah RPH yang dapat digunakan untuk fertilisasi *in vitro* adalah oosit dengan kualitas grade A dan B (Tabel 2).

Tabel 2. Kualitas oosit grade A dan B yang dapat digunakan untuk fertilisasi *in vitro*

Fase	Kualitas oosit		Jumlah	Rataan	Persentase (%)
	A	B			
Folikuler	42	63	105	21 \pm 8,75 ^a	41,02
Luteal	104	47	151	30,2 \pm 19,37 ^b	58,98

Keterangan: Superskrip yang sama pada satu kolom menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$).

Tabel 2 menunjukkan bahwa rata-rata oosit grade A dan B yang diperoleh pada fase luteal nyata lebih banyak ($30,2\pm 19,37$) dibandingkan fase folikuler ($21\pm 8,75$). Total perolehan oosit grade A dan B dari 10 pasang ovarium fase folikuler dan luteal yaitu 256 oosit. Jumlah oosit sapi PO grade A dan grade B pada fase folikuler sebanyak 105 oosit dan fase luteal sebanyak 151 oosit.

Tentunya potensi ini tidak dapat diabaikan mengingat sulitnya proses mendapatkan oosit secara langsung dengan metode MO (*multiple ovulation*) di dalam tubuh ternak. Jumlah dan

kualitas oosit yang dikoleksi dinilai dari tampilan sitoplasma dan ada tidaknya lapisan sel kumulus oophorus. Perkembangan oosit sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit yang digunakan pada proses FIV. Oosit yang berkualitas baik tidak hanya akan berhasil mencapai tahap pematangan inti namun juga akan mampu melewati berbagai tahap dalam pematangan sitoplasma yang dibutuhkan untuk proses fertilisasi. Kualitas oosit memberikan pengaruh terhadap pematangan oosit (maturasi). Proses pematangan oosit (ovum) secara *in vitro* ditandai dengan adanya kumulus oophorus yang berperan

sebagai mediator penyedia transport energi, mikro nutrisi dan molekul pembawa (*barrier*) untuk perkembangan oosit dan menjadi mediasi pengaruh hormon pada kompleks kumulus yang mengelilingi oosit (Goto *et al.* 1995). Sel kumulus yang mengelilingi oosit memainkan peranan penting dalam proses maturasi oosit secara *in vitro*.

Oosit yang dapat digunakan dalam proses fertilisasi secara *in vitro* adalah oosit yang berkualitas grade A dan B yaitu oosit yang masih dikelilingi sel kumulus oophorus. Sel-sel kumulus yang melekat pada zona pelusida berperan dalam pemeliharaan komunikasi intra selular serta mengatur pertumbuhan oosit dan maturasi dengan memfasilitasi dalam proses metabolisme hormonal serta transformasi nutrisi. Sel kumulus merupakan alat spesifik dalam mekanisme transduksi untuk transfer sinyal gonadotropin ke oosit melalui sistem *gap junction*. Hal ini didukung oleh Boediono *et al.* (1999), bahwa *gap junction* tersebut merupakan jalan lintas nutrisi untuk oosit. Menurut Amer *et al.* (2008), kualitas oosit grade C lapisan kumulus tidak terlalu padat dengan bentuk ooplasma yang tidak beraturan dan memiliki lapisan gelap dan kualitas oosit grade D oosit tanpa lapisan kumulus. Penentuan kualitas oosit dapat dilakukan dengan melakukan beberapa evaluasi terhadap oosit yang akan digunakan pada proses FIV. Seleksi oosit yang banyak digunakan adalah pemilihan oosit berdasarkan morfologi sel kumulus yang berada di sekitar oosit (Alvarez *et al.* 2009; Lonergan *et al.* 1994). Kualitas oosit grade C dan D tidak dapat digunakan untuk produksi embrio secara *in vitro* karena tidak mempunyai sel kumulus yang mengelilingi oosit sehingga tidak dapat dilakukan maturasi oosit atau over maturasi.

Rataan ovarium pada fase luteal lebih tinggi dibandingkan ovarium pada fase folikuler dari jumlah dan kualitas. Hasil penelitian didukung Yulnawati *et al.* (2005) bahwa jumlah folikel tertinggi didapat dari sepasang ovarium dengan adanya korpus luteum tanpa folikel dominan. Gordon (2003) melaporkan bahwa terdapat beberapa faktor yang dapat memengaruhi jumlah oosit yang diperoleh yaitu suhu dan lama waktu penyimpanan ovarium serta kualitas dan ukuran folikel. Beberapa faktor yang dapat memengaruhi kualitas oosit adalah umur, jenis hewan, siklus estrus, morfologi ovarium, kondisi tubuh dan nutrisi, status reproduksi, faktor genetik, dan faktor lingkungan. Penurunan kualitas oosit kemungkinan juga dapat disebabkan oleh lamanya waktu transportasi ovarium dari RPH menuju ke laboratorium. Jumlah oosit yang

berkualitas akan berpengaruh terhadap persentase keberhasilan proses fertilisasi. Semakin banyak jumlah oosit yang berkualitas, maka semakin banyak persentase hasil fertilisasi. Menurut Gordon (1994), oosit dengan kualitas baik akan mendukung terjadinya proses fertilisasi *in vitro*. Banyak faktor yang dapat memengaruhi keberhasilan fertilisasi *in vitro* salah satunya jumlah dan kualitas oosit (Hafez dan Hafez 2000).

KESIMPULAN DAN IMPLIKASI

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa produksi dan kualitas terbaik oosit dari ovarium limbah RPH berada pada fase luteal. Dari hasil penelitian dapat disarankan untuk melakukan aspirasi oosit dari ovarium sapi limbah RPH pada fase luteal untuk mendapatkan oosit dengan kualitas grade A dan B yang dapat digunakan dalam proses IVF. Perlu penelitian lebih lanjut untuk menguji keberhasilan penggunaan oosit sapi PO grade A dan B pada fase luteal untuk proses fertilisasi *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera LR. 2002. In vitro production of embryos in swine. *Theriogenology*. 57:256-273.
- Amer HA, AO Hegab, and SM Zaabal. 2008. Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cell, in vitro in buffaloes. *Journal of anim. Rep.* 5: 55 - 62.
- Alvarez GM 2009. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine kumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*. 33:167-177.
- Boediono A, Y Rusiantono, K Mohamad, I Djuwita, dan Y Sukra. 1999. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Peternakan dan Veterinar* 258-263.
- Gaspersz V. 1991. Teknik analisis dalam penelitian percobaan. Tarsito, Bandung.
- Goto K, T Yasuzuki, F Watani, dan T Shiniciro. 1995. In vitro development of bovine oocytes collected ovaries of individual cows after fertilization. *J Anim. Rep. Science*. 36:110-113.
- Gordon I. 2003. Laboratory production of cattle embryos. 2 Edition. CABI Publishing, Willingford UK.
- Gordon I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. University Press, Cambridge.

- Gustari S, KK Ni Wayan, RA Yuke, K Ian, dan S Bayu. 2009. Tingkat maturasi *in vitro* oosit kambing dalam medium suplementasi serum dan albumin. *Journal Veteriner*. 10(4):194-197.
- Hammam AM, CS Whisnant, A Elias, SM Zaabel, AO Hegab, and Abu-EI Naga EM. 2010. Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffalos (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.* 9:27-37.
- Hafez ESE and B Hafez. 2000. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation in reproduksi in farm animal. (Edited by Hafez B and ESE Hafez). 7 Edition. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Krisher RL, AM Brad, JR Herrick, ML Sparman, and JE Swain. 2007. A comparative analysis of metabolism and viability in porcine oocytes during *in vitro* maturation. *J. Anim Reprod Sci.* 98: 72-96.
- Maedomari N, K Kikuchi, M Ozawa, J Noguchi, H Kaneko, K Ohnuma, M Nakai, M Shino, T Nagai, and N Kashiwazaki. 2007. Cytoplasmic glutathione regulate by kumulus cells during porcine oocyte maturation affects fertilization and embryonic development *in vitro*. In: Gene expression profil of kumulus cells derived from kumulus-oocyte complexes matured either *in vivo* or *in vitro*. Tesfaye D, Ghanem N, Carter F, Fair T, Sirard MA, Hoelker M, Schellander K, Lonergan P. *Reproduction Fertility and Development*. 21:451-461.
- Pujol MM, L Bejar, and MT Paramio. 2004. Developmental competence of heifer oocyte selected using the brilliant crecyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61:35-44.
- Qian Y, QW Shi, and JT Ding. 2005. Effects of type and state of co-culture cells on *in-vitro* development of porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *J Assisted Rep. and Genetic*. 22: 233-238.
- Solihati N, D Tita, Lestari, H Kundrat, S Rangga, dan JN Lia. 2006. Perlakuan superovulasi sebelum pemotongan ternak (treatment superovulation before animal slughter). *Jurnal Ilmu Ternak*, 6 (2):145-149.
- Sumantri C dan A Anggraeni. 1999. Hubungan jumlah folikel per ovarium dengan kualitas oosit dan lama hari terbentuknya blastosit fertilisasi *in vitro* pada sapi Fries Holland. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*. 4 (4): 215-219.
- Sun QY dan T Nagai. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod and Dev.* 49: 347-359.
- Takagi Y, K Mori, T Takahashi, S Sugawara, and J Masaki. 1993. Differences in development of bovine oocyte recovered by aspiration or by slicing: studies on embryo transfer in animals. Tohoku University, Japan.
- Tanghe S, A Van Soom, H Nauwynck, M Coryn, dan A de Kruif. 2002. Minireview: function of kumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. in: gene expression profil of kumulus cells derived from kumulus-oocyte complexes matured either *in vivo* or *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*. 21:451-461.
- Ubarak S, SB Sumitro, MS Djati, dan Aulanni'am. 2001. Isolasi glikoprotein zona pelucida (ZP3) dari oosit folikular sapi dan sifat imunogenitasnya. *Biosain*. 1(1): 12 - 22.
- Yoon S, Son W, Lee, Moon J, Park S, Lim J. 2001. The *in vitro* maturation time of oocyte collected following *in vivo* hCG-priming in IVM/F-ET program are correlated with their kumulus cell pattern.
- Yulnawati, MA Setiadi, and A Boediono. 2005. Maturation and fertilization rate of ovine oocytes collected from different status of ovaries. *Proceedings, Reproductive Biotechnology for Improved Animal Breeding in Southeast Asia, Bali, Indonesia*: 199-202.
- Gandolfi F, AM Luciano, S Modina, A Ponzini, P Pocar, DT Armstrong, and A Lauria. 1997. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. *Theriogenology*. 48(7):1153-1160.
- Lonergan P, P Monaghan, D Rizo, MP Boland, and I Gordon. 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. *Mol. Reprod. And Developm.* 37:48-53.