

EFEKTIVITAS PENAMBAHAN SERUM SAPI PESISIR FASE BERAHI TERHADAP PEMATANGAN OOSIT KERBAU SECARA *IN VITRO*

J. HENDRI¹, HARISSATRIA¹, A. ASRI¹ DAN JASWANDI²

¹Universitas Mahaputra Muhammad Yamin

²Fakultas Peternakan Universitas Andalas

Jl. Jenderal Sudirman No.6, Kp. Jawa, Tj. Harapan, Solok, Sumatera Barat, 27317

E-mail : jonhendri@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to determine the percentage of buffalo oocytes matured in TCM-199 medium supplemented bovine serum pesisir estrus phase *in vitro*. Furthermore, to improve the efficiency of *in vitro* embryo production in buffalo cattle with bovine serum pesisir supplementation estrus phase. Buffalo oocytes matured in TCM-199 medium in 5% CO₂ incubator and each treatment was added bovine serum pesisir estrus phase with different concentrations (0%, 10% and 20%). Parameters observed in this study is the percentage of buffalo oocytes matured without the addition of bovine serum pesisir estrus phase, the percentage of mature oocytes by the addition of bovine serum pesisir estrus phase 10% and the percentage of buffalo oocytes were matured by the addition of bovine serum pesisir estrus phase 20% are *in vitro*. Percentage of buffalo oocytes matured with the addition of bovine serum pesisir phase estrus as much 20% showed a highly significant difference ($P < 0.01$) which is 70.04% when compared with the maturation by the addition of 10% bovine serum pesisir is 56.00% and without bovine serum pesisir estrus phase is 36.96% are *in vitro*. Based on the results of this study concluded that supplementation with bovine serum pesisir phase concentration of 20% in the maturation medium TCM-199 significantly ($P < 0.01$) in increasing the level of maturation of buffalo oocytes *in vitro* compared with the addition of bovine serum pesisir estrus phase and without the addition of 10% bovine serum pesisir (control).

Keywords : *in vitro*, serum, bovine pesisir, estrus phase

PENDAHULUAN

Ditinjau secara fisiologis, kerbau merupakan hewan semi akuatik (sedikit kelenjer keringat) dan tidak tahan dengan kondisi suhu panas. Akibat dari keadaan tersebut mengakibatkan efisiensi reproduksi yang rendah seperti *silent heat*, *calving interval* yang panjang sehingga mengakibatkan angka kelahiran yang rendah. Selanjutnya ternak kerbau memiliki jumlah folikel dalam ovarium yang sedikit, rendahnya respon superovulasi (Halдар dan Prakash, 2007).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak kerbau adalah dengan teknologi fertilisasi *in vitro*. Dengan teknologi fertilisasi *in vitro*, ovarium kerbau yang terbuang dari hasil pemotongan di Rumah Potong Hewan (RPH) dapat dimanfaatkan sebagai sumber embrio (Kochar *et al.*, 2002). Teknologi fertilisasi *in vitro* juga memberikan kesempatan untuk menghasilkan embrio yang layak untuk di transfer, namun peningkatan yang berarti belum terlihat pada pelaksanaan fertilisasi *in vitro* pada ternak kerbau, karena dipengaruhi oleh faktor media dan komposisi media yang digunakan belum sempurna selama

proses pematangan dan kultur secara *In Vitro* (Nandi *et al.*, 2002).

Secara teknis, rangkaian kegiatan fertilisasi *in vitro* terdiri atas serangkaian kegiatan yang meliputi pematangan oosit, fertilisasi, dan kultur embrio yang menggunakan beberapa bahan-bahan kimia yang dijual oleh industri farmasi dan diformulasi sebagai media untuk hidupnya embrio. Penggunaan bahan-bahan kimia tersebut belum sempurna untuk mempertahankan viabilitas oosit sampai perkembangan tahap embrio. Selain bahan kimia, serum juga banyak mengandung protein, vitamin, mineral serta hormon estradiol yang dapat menghasilkan faktor pertumbuhan sehingga penambahan serum ke dalam media pematangan oosit dapat dijadikan sebagai bahan alternatif sebagai sumber nutrisi dan membantu pertumbuhan oosit sampai tahap embrio secara *in vitro* (Ganong, 2003).

Serum atau plasma darah adalah bagian dari darah, merupakan suatu larutan yang luar biasa mengandung banyak sekali ion, molekul anorganik dan molekul organik yang diangkut ke berbagai bagian tubuh atau membantu transport zat-zat lain. Serum mengandung gas, glukosa, lemak, substansi non protein, nitrogen, enzim, hormon, vitamin, dan pigmen. Protein

serum terdiri dari 90% air dan 10% zat padat. Bahan padat ini terdiri dari 7% protein yang meliputi antibodi, fosfolipida kolesterol, glukosa, enzim sedangkan bahan anorganik bukan protein terdiri dari P, Na, Ca, K, Mg, Fe, dan HCO_3 (Ganong, 2003).

Serum mengandung bermacam-macam protein dan mineral yang merupakan sumber unsur hara makro dan mikro. Kandungan protein atau mineral di dalam serum darah dari berbagai hewan berlainan baik kualitas dan kuantitasnya, karena hal ini di pengaruhi oleh macam pakan hewannya. Kandungan unsur hara yang dimiliki dalam komponen serum darah sapi antara lain (mg/100gr) yaitu N = 0,0084; P = 0,1000; K = 0,0098; C-Organik = 3,2760; Bahan Organik = 56,4800; Kadar Air = 93,9590 dan komponen serum darah ayam antara lain yaitu N = 0,0058; P = 0,2000; K = 0,0145; C-Organik = 5,3040; Bahan Organik = 9,1400, dan Kadar Air = 89,930% (Dukes dalam Rahayu, 2002).

Konsentrasi hormon estrogen dan estradiol dalam serum sapi tergantung pada fase berahi pada hewan tersebut. Konsentrasi hormon estradiol dalam serum pada fase puncak berahi pada seekor hewan yaitu 211,25-247,77 pg/ml (Widiyono *et al.*, 2011). Meidan *et al.*, (1993) menyatakan konsentrasi estradiol sapi pada folikel dominan 379,6 ng/ml. Jyotsna dan Medhamurti (2009) menyatakan konsentrasi estradiol kerbau pada folikel dominan 125,8 ng/ml. Selanjutnya menurut hasil penelitian Harissatria (2010), konsentrasi estradiol dalam media pematangan oosit kerbau setelah ditambahkan sel folikel de graaf sapi yaitu 3053,3 pg/ml.

Peningkatan yang berarti dalam pelaksanaan teknologi fertilisasi *in vitro* ternak kerbau belum terlihat begitu signifikan karena mahalnya biaya produksi embrio, belum sempurnanya pematangan oosit serta fertilisasi *in vitro* yang rendah. Pada penelitian ini dicoba penambahan beberapa konsentrasi serum sapi pesisir fase berahi kedalam media pematangan oosit kerbau sebagai bahan alternatif untuk meningkatkan angka pematangan oosit kerbau secara *in vitro*. Penambahan beberapa konsentasi serum sapi pesisir fase berahi diharapkan dapat meningkatkan angka pematangan oosit kerbau secara *in vitro* dan meningkatkan efisiensi produksi embrio kerbau secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Materi dalam penelitian ini menggunakan ovarium ternak kerbau yang telah terbuang dari Rumah Potong Hewan kemudian diambil dan dimasukkan dalam termos yang berisi NaCl fisiologis 0,9% dan dibawa ke laboratorium untuk dilakukan koleksi oosit.

Oosit dari ovarium ternak kerbau yang di potong di Rumah Potong Hewan (RPH) dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi NaCl fisiologis 0,9% pada temperatur 30-35°C. Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara menyayat ovarium (*slicing*) dengan ukuran folikel 2-6 mm dalam Petri dish yang berisi media PBS yang ditambahkan dengan beberapa konsentrasi serum sapi pesisir fase berahi 10% dan 20% serta Gentamisin 10 µg/ml. Oosit yang terlepas dari ovarium langsung diamati di bawah mikroskop, dan oosit yang digunakan dalam pematangan adalah oosit yang dikelilingi oleh sel-sel kumulus kompak dan mempunyai sitoplasma yang homogen.

Prosedur pematangan dilakukan menurut prosedur yang dikemukakan Boediono *et al.*, (2003). Oosit yang diperoleh dicuci 2 kali dalam media PBS dan dilanjutkan dalam media pematangan. Media pematangan oosit yang digunakan adalah TCM-199. Media TCM-199 ditambahkan dengan serum sapi pesisir fase berahi 10% dan 20% serta Gentamisin 10 µg/ml sebagai antibiotik.

Setelah oosit kerbau terkoleksi, maka selanjutnya dilakukan pembagian jumlah oosit yang didapat secara sama banyak dan dimasukkan ke dalam masing-masing yaitu penambahan serum sapi pesisir fase berahi 0% sebagai kontrol, 10 % sebagai perlakuan pertama dan 20% sebagai perlakuan ke dua dan dilapisi dengan mineral oil dan ketiga Petridis tersebut dimasukkan dalam inkubator CO_2 5% selama 24 jam.

Oosit yang telah mengalami proses pematangan dalam media TCM-199 yang ditambahkan serum sapi pesisir fase berahi selama 24 jam pada incubator CO_2 5%, dicuci untuk membuang sel-sel kumulusnya dalam media TCM-199. Setelah pencucian oosit selesai, oosit langsung diamati untuk melihat ekspansi sel komulus atau polar body yang dihitung berdasarkan persentase oosit matang

dibagi dengan jumlah yang dimatangkan dikali 100% (Kobayashi *et al.*, 1994).

Peubah yang Diamati

1. Persentase oosit kerbau yang matang tanpa penambahan serum sapi pesisir fase berahi dalam media pematangan secara *in vitro*.
2. Persentase oosit kerbau yang matang dengan penambahan serum sapi pesisir fase berahi 10% dalam media pematangan secara *in vitro*.

3. Persentase oosit kerbau yang matang tanpa penambahan serum sapi pesisir fase berahi 20% dalam media pematangan secara *in vitro*.

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan dan 6 ulangan sebagai kelompok (hari). Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan sidik ragam (*Analysis of Variance/ANOVA*), seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Analisis keragaman rancangan acak kelompok (RAK)

SK	DB	JK	KT	F _{hitung}	F _{tabel} 0,05	0,01
Perlakuan	(3-1)=2	JKP	JKP/2	KTP/KTS	3,33	5,64
Kelompok	(6-1)=5	JKK	JKK/5	KTK/KTS	4,10	7,56
Sisa	(t-1)(k-1)=10	JKS	JKS/5			
Total	(t.r-1)=17	JKT				

Keterangan : SK = Sumber Keragaman
 F.Hitung < F.Tabel 5% (berbeda tidak nyata)
 F.Hitung > F.Tabel 5% (berbeda nyata)
 F.Hitung > F.Tabel 1% (berbeda sangat nyata)

Jika hasil F Hitung berbeda nyata dan sangat nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) (Steel dan Torrie, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase Oosit Kerbau yang Matang pada Masing-masing Penambahan Serum Sapi Pesisir Fase Berahi (0%, 10%, dan 20%) Secara *In Vitro*

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis statistik, maka persentase oosit yang matang pada masing-masing perlakuan dalam media TCM-199 dengan penambahan serum sapi pesisir fase berahi adalah, kontrol (36,96%), perlakuan penambahan serum sapi pesisir 10% (56,00%), dan perlakuan 20% (70,04%). Persentase tingkat kematangan pada masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Persentase oosit kerbau yang matang pada berbagai penambahan serum sapi pesisir fase berahi (%)

Perlakuan	n	Persentase Oosit Kerbau Matang (%)
A (kontrol)	58	36,96 ^a
B (penambahan serum 10%)	59	56,00 ^a
C (penambahan serum 20 %)	60	70,04 ^b

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda sangat nyata (P<0,01)

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa penambahan serum sapi pesisir fase berahi sebanyak 20% dalam media pematangan oosit kerbau secara *in vitro* menghasilkan persentase kematangan sangat nyata (P<0,01) lebih tinggi dibandingkan pematangan dengan penambahan serum sapi pesisir fase berahi 10% dan tanpa penambahan serum sapi pesisir fase berahi. Persentase kematangan oosit kerbau dengan penambahan serum sapi pesisir fase berahi dengan konsentrasi 10% dan tanpa

penambahan serum sapi pesisir fase berahi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (P>0,05).

Hal ini berarti bahwa penambahan serum sapi pesisir fase berahi dengan konsentrasi 20% dalam media pematangan oosit kerbau cukup efektif untuk meningkatkan keberhasilan pematangan oosit kerbau secara *in vitro*. Persentase kematangan yang lebih tinggi dari penambahan serum sapi pesisir fase berahi dengan konsentrasi 20% diduga serum

sapi pesisir fase berahi lebih banyak menghasilkan hormon estradiol yang berguna dalam proses pematangan inti dan sitoplasma oosit. Penambahan serum sapi pesisir 10% dan tanpa penambahan serum sapi pesisir fase berahi tidak signifikan karena sedikitnya hormon estradiol yang disekresikan dalam media pematangan sehingga tidak begitu menunjang pematangan dari oosit kerbau secara *in vitro*.

Tingginya persentase tingkat kematangan oosit kerbau dengan penambahan serum sapi pesisir dengan konsentrasi 20% karena serum sapi pesisir fase berahi lebih dominan mensekresi estradiol, sehingga dapat merangsang pertumbuhan oosit untuk tahap selanjutnya. Hasil penelitian tersebut sependapat dengan yang dinyatakan oleh Skiner dalam Trounson (1992), bahwa pengaruh positif dari adanya serum sapi fase berahi pada proses maturasi oosit *in vitro* diduga bereaksi melalui sel-sel kumulus atau secara langsung pada oosit. Serum juga mengandung faktor pertumbuhan yang memiliki peranan dalam pengaturan maturasi oosit, khususnya melalui sel-sel kumulus. Selanjutnya menurut Adlak *et al.*, (2008) penambahan 1 $\mu\text{l/ml}$ estradiol akan meningkatkan pematangan oosit kerbau secara *in vitro*.

Peningkatan konsentrasi serum dalam media pematangan dengan batasan tertentu akan meningkatkan rataan maturasi tahap M-II. Hal ini berarti semakin meningkat konsentrasi serum diduga akan meningkatkan konsentrasi berbagai komponen pemicu terjadinya proses maturasi yang terkandung di dalam serum seperti hormon, protein, energi dan berbagai faktor lainnya sehingga memberikan hasil yang optimal pada proses maturasi oosit. Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian sebelumnya menurut Djati *et al.* (1999), bahwa tingkat maturasi oosit kambing tahap M-II dalam TCM-199+20% EGS (*estrus goat serum*) (68,0%) lebih baik dibandingkan dengan TCM1-99+10% EGS (50,0%). Rao *et al.* (2002), mengatakan bahwa suplementasi ESS20% dalam media maturasi TCM-199 menghasilkan tingkat maturasi tahap M-II oosit domba sebesar 86,0%. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi serum 20% dalam media maturasi memberikan pengaruh yang positif terhadap peningkatan angka maturasi. Pendapat ini juga diperkuat oleh

pernyataan Lonergan (1992) dan Monaghan yang disitasi Gordon (1994) bahwa konsentrasi serum terbaik untuk maturasi oosit *in vitro* bervariasi antara 10-20%.

Penggunaan serum hewan estrus pada hari ke 7 pasca estrus memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan serum jenis lain. Hendri (1999) mendapatkan angka pematangan yang lebih tinggi pada media yang menggunakan serum induk estrus (H0) dan awal estrus (H7) dibandingkan dengan FBS 5%. Hasil penelitian tersebut dikemukakan bahwa penggunaan kedua serum disarankan 10-15%. Jenis serum lain yang sering ditambahkan dalam medium adalah Calf Serum (CS) dan Bovine Serum Albumin (BSA) (Gordon, 1994)

Dalam serangkaian proses pelaksanaan pematangan oosit secara *in vitro*, banyak hal dan faktor yang mempengaruhi diantaranya, pemilihan media yang tepat dan faktor-faktor pertumbuhan yang terkandung dalam media. Media pematangan oosit mempunyai peranan penting terhadap kelanjutan proses fertilisasi *in vitro*. Media pematangan oosit yang digunakan dalam pematangan tidak hanya berpengaruh terhadap jumlah oosit yang dapat mencapai tahap M-II, dan mampu untuk melaksanakan fertilisasi, tetapi juga berpengaruh terhadap perkembangan embrio selanjutnya (Bavister *et al.*, 1992; Totey *et al.*, 1993). Penambahan FSH 10 $\mu\text{l/ml}$ dalam media pematangan dapat meningkatkan kematangan oosit, sehingga oosit mampu melakukan fertilisasi atau perkembangan embrio berikutnya (Brackett *et al.*, 1989; Saeki *et al.*, 1990).

Penelitian pematangan oosit domba secara *in vitro* penambahan serum domba juga berpengaruh terhadap angka maturasi oosit. Suplementasi serum domba estrus (ESS) hari ke-0 konsentrasi 10% dan serum pasca estrus (hari ke-6) konsentrasi 10% dalam media TCM-199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II (68,7 dan 67,6%), lebih baik dibandingkan dengan *fetal lamb serum* (FLS) konsentrasi 10% (32,9%) (Rusiyantono *et al.*, 2000).

Super-ovulated cow serum (SCS) konsentrasi 10% dan *fetal calf serum* (FCS) konsentrasi 10% dalam media TCM199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II (28,0 dan 22,2%) (Djuwita *et al.*, 1995). ESS konsentrasi 20% dan *ovine*

follicular fluid (OFF) konsentrasi 20% dalam media TCM199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II masing-masing ESS (86,0%) dan OFF (76,0%) (Rao *et al.*, 2002).

Selama ini serum yang digunakan sebagai bahan suplementasi berasal dari industri farmasi seperti: *estrus cow serum* (ECS), *bovine serum* (BS), *fetal calf serum* (FCS), *bovine serum albumin* (BSA) dan serum domba (SS) dengan harga relatif mahal, kemasan besar dan pada daerah tertentu sulit didapat. Mengingat factor tersebut maka perlu diupayakan serum alternatif seperti : ESS yang dapat diadakan di laboratorium dan digunakan sebagai bahan suplementasi untuk meningkatkan kualitas media. Penelitian bertujuan meneliti pengaruh SS dan ESS dengan berbagai konsentrasi terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit domba *in vitro*.

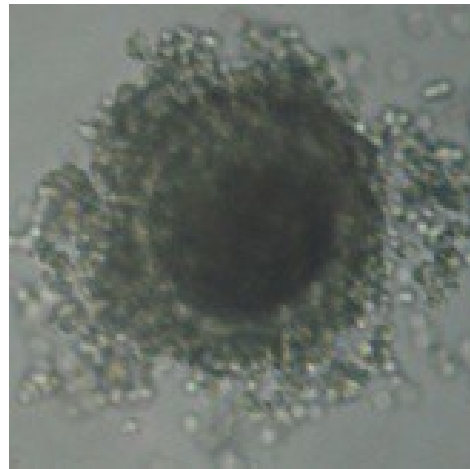
Penelitian ini menggunakan media TCM-199 (Sigma), dan suhu dalam inkubator CO2 berkisar 38°C, kualitas dari oosit yang digunakan adalah kualitas A dengan tanda-tanda oosit dikelilingi oleh sel kumulus yang kompak, sitoplasma yang homogen dan umur dari oosit tersebut setelah diambil sampai selesai dikoleksi tidak lebih dari 6 jam. Sumber serum sapi pesisir yang digunakan adalah serum sapi pesisir pada fase berahi. Oosit kerbau yang digunakan pada penelitian ini menggunakan oosit dari ukuran besar dari 5 mm dan dapat dilihat pada gambar di bawah ini.



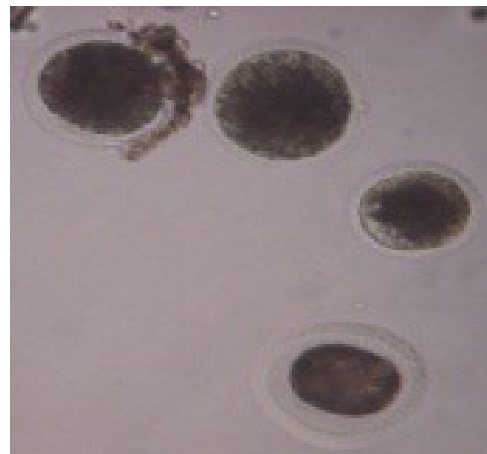
Gambar 1. Ovarium dan ukuran folikel kerbau

Keadaan morfologis oosit yang mengalami pematangan yang sempurna dapat dilihat dari adanya perkembangan inti oosit, adanya satu polar body. Disamping itu, apabila diamati dari keadaan sel kumulusnya terlihat adanya ekspansi atau penyebaran sel-sel kumulus disekeliling oosit setelah dimatangkan

(Kobayashi *et al.*, 1994). Kondisi oosit matang dengan sel kumulus yang memperlihatkan ekspansi dan polar body dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Oosit yang matang dengan ekspansi sel kumulus



Gambar 3. Oosit yang matang dengan penampakan 1 polar body

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serum sapi pesisir fase berahi dengan konsentrasi 20% dalam media maturasi TCM-199 sangat nyata ($P < 0,01$) meningkatkan tingkat maturasi oosit kerbau secara *invitro* dibandingkan dengan penambahan serum sapi pesisir fase berahi 10% dan tanpa penambahan serum sapi pesisir (kontrol).

Dengan hasil penelitian tersebut, serum sapi pesisir fase berahi dapat digunakan sebagai serum alternatif untuk meningkatkan persentase angka pematangan pada oosit kerbau secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adlak, S.A., K.P. Khillare, K.P, Pawshe, C.H and Mude. 2008. Influence of Serum and Hormones on *In vitro* maturation of Buffalo Oocytes. *Veterinary World*. 1(8) : 243-244.
- Bavister, B.D., T.A. Rose-Hallekant and T. Pinyopummintr. 1992. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos in to morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 37 : 127-146.
- Boediono A, T. Suzuki, and R. Godke. 2003. Comparison of hybrid and purebred *in vitro*-derived cattle embryos during *in vitro* culture. *Anim Reprod Sci*. 78 : 1-11.
- Brackett, B.G., A.I. Younis and R.A. Fayrer-Hosken. 1989. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentration of luteinizing hormone. *Fertil. Steril*. 52 : 319-324.
- Djati, S., Fatchiyah, G. Ciptadi, N. Ianaini, S. Wahyuningsih, S. Rahayu dan L. Anggraini. 1999. Tingkat transformasi inti oosit kambing pada medium TCM-199 dengan berbagai konsentrasi estrus goat serum. Abstrak Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia. Forum Komunikasi Reproduksi, Malang, 19-20 Mei 1999.
- Djuwita, I., B. Purwantara, M. Fahrudin and Y. Sukra. 1995. The effect of superovulated cow serum on *in vitro* maturation and fertilization in sheep. *Pros. Symposiumon Biotechnology of Animal Reproduction*, Bogor. hlm.20-22.
- Ganong W.F. 2003. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Widjajakusumah HMD Penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. Terjemahan dari: Review of Medical Physiology
- Gordon, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos. *Biotechnology in Agri-cultural Series*. CAB. Int.
- Haldar, A. and B.S. Prakash. 2007. Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91:326-332.
- Harissatria. 2010. Persentase kematangan dan fertilisasi oosit kerbau dengan penambahan sel folikel kerbau dan sapi secara *In Vitro*. Thesis Program Pascasarjana Universitas Andalas. Padang.
- Hendri. 1999. Penambahan berbagai jenis serum pada medium TCM-199 untuk produksi embrio sapi melalui teknik fertilisasi *in vitro*. *Jurnal peternakan dan Lingkungan*. 5 : 1-8.
- Jyotsna U.R. and R. Medhamurthy. 2009. Standardization and validation of an induced ovulation model system in buffalo cows: characterization of gene expression changes in the periovulatory follicle. *Animal Reproduction Science*. 113(1-4) : 71-81.
- Kobayashi, K., S. Yamashita, and H. Hoshi 1994. Influence of epidermal growth factors and transforming growth factors on *in vitro* maturation of cumulus cell enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fertil*. 100 : 439-446.
- Kochar, H.P., B. Wu, L.H. Morris, B.C. Buckrell, J.W. Pollard, P.K. Basrul and W.A. King. 2002. Maturation status, protein synthesis and development competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod. Domes. Anim*. 37 : 19-25.
- Lonergan. P, Syarif H, Monaghan P, Wahid H, Gallagher M and Gordon I. 1992. Effect of Size on Bovine Oocyte Morphology and Embryos Yield Following Maturation, Fertilization and Culture *In Vitro*. *Theriogenology* 54 : 1420-1429.
- Meidan, R., D. Wolfenson, W.W. Thatcher, E. Gilad, L. Aflalo, Y. Greber, E. Shoshani and E. Girsh. 1993. Oxytocin and estradiol concentrations in follicular fluid as a means for the classification of large bovine follicles. *Theriogenology*. 39 : 421-432.
- Nandi, S., H.M. Raghu, B.M. Ravindranatha, and M.S. Chauhan. 2002. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos *in vitro*: premises and promises. *Reprod. Domest. Anim*. 37 : 65-74.
- Rao, B.S., K.S. Naidu, D. Amarnoth, R. Vagdevi, A.S. Rao, K.V. Brahmhandv. and H. Rao. 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin. Res*. 43 : 31-36.
- Rusiyantono, Y., I. Djuwita, B. Purwantara and Y. Sukra. 2000. The influence of ewe serum on *in vitro* oocyte maturation and early development of ovine embryos. *Media Vet*. 7(1) : 13-16.

Saeki, K., M.L. Leibfried-Rutledge and N.L. First. 1990. Are fetal calf serum and hormones necessary during *in vitro* maturation of cattle oocytes for subsequent development. *Theriogenology*. 33:316 (Abst).

Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1994. Prinsip dan Prosedur Statistik. Suatu Pendekatan Biometrik (diterjemahkan oleh: B. Soemantri). Gramedia, Jakarta.

Widiyono. I., Prabowo P. P, Sarmin , Pudji. A, Claude M. A. 2011. Kadar Estradiol dan Progesteron Serum, Tampilan Vulva dan Sitologi Apus Vagina Kambing Bligon Selama Siklus Birahi. *Jurnal Veteriner*. 12(4) : 263-268.

Totey, S.M., C.H. Pawshe and G.P. Singh. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes : effect of media hormone and sera. *Theriogenology* 39 : 1153-1171.