
PEMATANGAN OOSIT DOMBA SECARA *IN VITRO* DALAM BERBAGAI JENIS SERUM

Jeffrie Wattimena

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura,
Jln. Ir. M. Putuhena, Kampus Poka-Ambon 97233, Tel. 0911-315984;
E-mail: jeffriewm@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh jenis serum {*sheep serum* (SS), *pregnant sheep serum* (PSS) dan *estrus sheep serum* (ESS)} terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. Materi penelitian menggunakan oosit domba lokal yang dikoleksi dari ovarium domba yang diambil dari rumah pemotongan hewan (RPH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis serum berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap perkembangan inti oosit domba tahap *germinal vesicle* (GV) dan *germinal vesicle breakdown* (GVBD), sedang untuk tahap *metafase-I* (M-I) dan *metafase-II* (M-II) jenis serum berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap perkembangan inti oosit domba. Perkembangan inti oosit domba tahap GV untuk masing-masing jenis serum 5,36% (SS), 1,04% (PSS) dan 0,00% (ESS). Tahap GVBD masing-masing 8,21% (SS), 4,22% (PSS) dan 2,31% (ESS). Tahap M-I berturut-turut 28,65% (SS), 25,77% (PSS) dan 17,71% (ESS). Tahap M-II berturut-turut 57,78% (SS), 68,97% (PSS) dan 79,98% (ESS). Disimpulkan bahwa suplementasi 20% ESS dalam media maturasi (CR1aa) oosit domba adalah yang terbaik, dalam proses pematangan oosit domba *in vitro*.

Kata kunci: serum, domba, maturasi, oosit.

IN VITRO MATURATION OF OVINE OOCYTE IN VARIOUS SERUM

ABSTRACT

The aim of this research was to know the effect of various serum {*sheep serum* (SS), *pregnant sheep serum* (PSS) dan *estrus sheep serum* (ESS)} on *in vitro* ovine oocyte maturation. Material of this research is oocyte and ovary of local sheep gathered from slaughterhouse. Results showed that various of serum were no significant affected ($P>0.05$) nucleolus development oocyte on *germinal vesicle* (GV) and *germinal vesicle breakdown* (GVBD) phase. Various of serum was significant affected ($P<0.05$) development of oocyte nucleus on *metafase-I* (M-I) and *metafase-II* (M-II) phase. The average of GV phase were 5.36% (SS), 1.04% (PSS) dan 0.00% (ESS) respectively. The nucleolus development on GVBD phase respectively 8.21% (SS), 4.22% (PSS) dan 2.31% (ESS). Phase M-I respectively 28.65% (SS), 25.77% (PSS) and 17.71% (ESS). Phase M-II respectively 57.78% (SS), 68.97% (PSS) and 79.98% (ESS) respectively. It was concluded that supplementation of 20% ESS in maturation medium (CR1aa) ovine oocytes are the best, in the process of maturation of ovine oocytes *in vitro*.

Key words: serum, sheep, maturation, oocyte.

PENDAHULUAN

Produksi embrio secara *in vitro* dalam beberapa tahun terakhir ini berkembang dengan pesat melalui penggunaan teknologi fertilisasi *in vitro* (FIV). Fertilisasi *in vitro* merupakan salah satu bioteknologi reproduksi yang dapat dipakai untuk memproduksi embrio dengan memanfaatkan ovarium yang bersumber dari ternak yang masih hidup maupun yang telah dipotong. Ovarium yang berasal dari rumah pemotongan hewan (RPH) merupakan sumber oosit yang

mudah dan tersedia dalam jumlah yang banyak dan dapat dimanfaatkan secara optimal.

In vitro maturation (IVM) merupakan salah satu tahap yang penting pada proses fertilisasi *in vitro* dan keberhasilan proses maturasi sangat ditentukan oleh kualitas media kultur yang digunakan. Dua bahan utama yang umumnya digunakan untuk meningkatkan kualitas media kultur adalah protein dan hormon (Zeng & Sirard, 1992). Serum dapat dipakai sebagai sumber protein dalam media kultur, karena serum memiliki berbagai komponen esensial seperti;

protein, hormon, faktor-faktor pertumbuhan, mineral dan lipid (Langendock *et al.*, 1997; Boediono *et al.*, 2000). Suplementasi serum dalam media maturasi bertujuan untuk meningkatkan angka maturasi. Berbagai jenis serum dapat digunakan sebagai bahan suplementasi pada media maturasi oosit domba dan kambing antara lain; *fetal bovine serum* (FBS) (Wani *et al.*, 2000; Nava & Tajik, 2000), *estrus sheep serum* (ESS) (Nava & Tajik, 2000; Wattimena, 2006), *ewe serum* (ES) hari ke-0 dan ke-6 (Rusiyantono *et al.*, 2000), *sheep serum* (SS) (Wattimena, 2004), *pregnant sheep serum* (PSS) (Wattimena, 2006), *fetal calf serum* (FCS) (Rho *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007) dan *estrus goat serum* (EGS) (Rahman *et al.*, 2007).

Komposisi atau bahan-bahan yang terkandung di dalam serum sangat bergantung pada waktu mana sampel darah diambil untuk pembuatannya, apakah pada waktu tidak estrus, estrus atau, bunting. Serum yang dikoleksi pada saat estrus akan memberikan respons yang baik terhadap tingkat maturasi karena serum mengandung hormon dan faktor-faktor lain yang potensial untuk perkembangannya (Younis *et al.*, 1989). Maturasi oosit sangat dipengaruhi oleh keseimbangan antara hormon estrogen dan progesteron. Estrogen berperan pada proses proliferasi sel sedangkan progesteron merangsang diferensiasi sel atau jaringan (Gordon, 1984; Lorenzo *et al.*, 1997).

Meskipun telah banyak dilakukan penelitian tentang pengaruh jenis serum terhadap tingkat maturasi oosit, tetapi umumnya jenis serum yang digunakan adalah produk industri farmasi, dimana pada daerah tertentu sulit didapat dan harganya relatif lebih mahal sedangkan jenis-jenis serum tersebut dapat dibuat sendiri. Oleh sebab itu telah dilakukan penelitian untuk membandingkan satu jenis serum produk industri farmasi *sheep serum* yang belum banyak digunakan sebagai imbuhan dalam media kultur dengan *pregnant sheep serum* dan *estrus sheep serum*. Kedua jenis serum yang terakhir dibuat sendiri di laboratorium. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji pengaruh jenis serum terhadap tingkat maturasi oosit domba secara *in vitro*.

METODOLOGI

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL). Media maturasi yang digunakan adalah *Charles Rosenkrans-1aa* (CR1aa) dengan

3 perlakuan jenis serum yaitu; *sheep serum* (SS), *pregnant sheep serum* (PSS) dan *estrus sheep serum* (ESS) masing-masing dengan konsentrasi 20%. Parameter yang diamati adalah; tingkat perkembangan oosit tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), *metafase-I* (M-I) dan *metafase-II* (M-II). Jumlah oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebanyak 220 oosit terdiri dari perlakuan satu (suplementasi *sheep serum*) 73 oosit, perlakuan dua (suplementasi *pregnant sheep serum*) 71 oosit dan perlakuan tiga (suplementasi *estrus sheep serum*) 76 oosit. Data dianalisis berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan ulangan sebanyak 6 kali dimana masing-masing ulangan terdiri dari 10-15 oosit, dan diuji dengan uji wilayah berganda Duncan's (Gaspersz, 1994). Domba yang dipotong adalah domba lokal (domba garut) umur 1,5 tahun sampai 3,5 tahun.

Media koleksi ovarium adalah NaCl fis.+penicillin 100 IU mL⁻¹ dan streptomycin 100 µg/mL. Media koleksi oosit adalah *modified phosphate buffered saline* (+) (mPBS+). Media maturasi adalah CR1aa + penicillin 100 IU mL⁻¹, streptomycin 100 µg mL⁻¹ dan *follicle stimulating hormone* (Sigma USA) 0,01 mg/mL ditambah masing-masing jenis serum sesuai perlakuan. Pembuatan *estrus sheep serum* (ESS) yaitu melalui pengamatan estrus pada domba betina yang akan dikoleksi darahnya dan darah dikoleksi pada hari ke-0 setelah tanda estrus terlihat (Boediono *et al.*, 2000; Rusiyantono *et al.*, 2000). Pembuatan *pregnant sheep serum* (PSS), darah langsung dikoleksi dari induk bunting dengan umur kebuntingan 2-3 bulan, dimana berdasarkan hasil penelitian konsentrasi progesteron mencapai puncak pada umur kebuntingan tersebut. Prosedur pembuatan *pregnant sheep serum* dan *estrus sheep serum* sebagai berikut: a). darah diambil menggunakan venoject dari *vena jugularis*, sebanyak 10 mL; b). darah yang ditampung disimpan dalam refrigerator selama 20 menit; c). supernatan diambil dan dicentrifuge, kecepatan 1500G selama 10 menit; d). serum diinaktivasi dalam penangas air suhu 56°C selama 30 menit dan e). serum dikemas dalam tabung Eppendorf ukuran 1,5 mL, disimpan dalam freezer suhu -20°C (Butler, 1996). *Sheep serum* (SS) yang digunakan adalah produk industri farmasi Sigma USA, 100 mL.

Ovarium yang digunakan dalam penelitian bersumber dari ovarium domba lokal, dikoleksi dari RPH dan disimpan dalam termos dengan

media koleksi (NaCl fis.) suhu 30-35°C. Ovarium dibilas dengan media koleksi dan oosit dikoleksi dengan metode *slicing*, oosit dicuci 3 kali pencucian terakhir dengan media maturasi (CR1aa). Hanya oosit kualitas A dan B yang digunakan sebagai sampel penelitian. Tiga spot media maturasi oosit (CR1aa) dibuat pada petri-dish (100 µL/drop), ditutup dengan mineral oil (Sigma, USA). Oosit dipindahkan ke dalam spot media maturasi (10-15 oosit) sesuai perlakuan diinkubasi selama 24 jam, suhu 38,5°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%. Evaluasi hasil maturasi dengan metode pewarnaan *aceto-orcein* (Pawshet *et al.*, 1994; Sharma *et al.*, 2001). Setelah penggundulan sel-sel kumulus, oosit difiksasi dalam larutan *asam asetat* dan *ethanol* (1:3) pada suhu kamar selama 24 jam. Oosit diwarnai dengan 1% *orcein* dalam 45% *asam asetat* kemudian dievaluasi dengan mikroskop fase-kontras.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis serum berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap oosit tidak maturasi (tahap GV dan tahap GVBD), sedangkan pada fase Metafase-I serum ESS (17,71%) berpengaruh nyata ($P<0,05$) lebih baik dibanding serum SS (28,65%) dan serum PSS (25,77%). Hal ini mengindikasikan bahwa ESS mampu menstimulasi pematangan oosit sehingga hanya 17,71% oosit yang tidak maturasi.

Tertahannya sejumlah oosit pada tahap M-I diduga disebabkan oleh lama waktu maturasi yang dalam penelitian ini dilakukan selama 24 jam. Hasil penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa tingkat maturasi oosit kambing (tahap M-II) yang dikultur selama 26 jam (88,0%) lebih besar dibanding 22 jam (68,0%) dan 18 jam (42,5%) (Rusiyantono, 2001). Dikatakan pula rataan oosit tidak maturasi (tahap M-I) untuk lama waktu maturasi 26 jam (10,0%) lebih kecil dibanding lama waktu maturasi 22 jam (16,0%) dan 18 jam (27,50%). Ciptadi dkk., (1999) mengatakan bahwa terdapat interaksi antara waktu maturasi oosit kambing dengan tingkat maturasi inti dan tingkat maturasi (62,0%) diperoleh pada lama waktu maturasi 30 jam. Menurut Rahman *et al.*, (2008), secara *in vivo* sama seperti oosit mamalia lainnya maka oosit kambing dan domba akan beristirahat setelah memasuki fase *dictyate* atau fase *germinal vesicle* (GV) hingga kambing dan domba memasuki masa pubertas. Secara *in vitro* oosit akan mengalami pertumbuhan yang optimal setelah keluar dari folikel dan ketika dikultur dalam media maturasi secara spontan akan mengalami pembelahan meiosis dan pematangan ooplasmic. Motlagh *et al.*, (2008), melaporkan bahwa oosit domba akan melewati fase GV setelah dikultur selama 6-8 jam, fase GVBD antara 8-9 jam dan fase metafase-I (M-I) selama 12-18 jam. Jadi oosit domba akan mengalami pematangan (fase metafase-II/M-II) secara optimal setelah dikultur selama 27 jam pada suhu 38,5°C.

Tabel 1. Pengaruh Perlakuan Terhadap Tahap Perkembangan Oosit (Tahap GV, GVBD, Metafase-I dan Metafase-II).

Perlakuan	Jumlah Oosit	Tahap Perkembangan (Jml Oosit)			
		GV	GVBD	M-I	M-II
SS	73	5,36 (4) ^a	8,21 (6) ^a	28,65 (21) ^a	57,78 (42) ^a
PSS	71	1,04 (1) ^a	4,22 (3) ^a	25,77 (18) ^a	68,97 (49) ^b
ESS	76	0,00 (0) ^a	2,31 (2) ^a	17,71 (13) ^b	79,98 (61) ^c

Keterangan: SS = Sheep Serum; PSS = Pregnant Sheep Serum; ESS = Estrus Sheep Serum
Huruf yang berbeda pada kolom menunjukkan perlakuan berbeda nyata ($P<0,05$)

Hasil penelitian (Tabel 1) menunjukkan bahwa ESS (79,98%) nyata ($P<0,05$) meningkatkan angka maturasi oosit domba lebih baik dibanding PSS (68,97%) dan SS (57,78%). Hal ini mengindikasikan bahwa potensi yang lebih baik dalam meningkatkan aktivitas pematangan inti oosit (tahap metafase-II/M-II). Hasil penelitian ini sejalan dengan apa yang dilaporkan oleh Rao *et*

al., (2002), bahwa suplementasi 20% ESS dalam media maturasi TCM199 (*tissue culture medium* 199) menghasilkan angka maturasi oosit domba sebesar 86,0%. Nava & Tajik, (2000) melaporkan bahwa 10% ESS meningkatkan angka maturasi (82%) oosit domba lebih baik dibanding 10% FBS (70%). Demikian pula dengan yang dilaporkan oleh Tajik & Esfandabadi (2003), bahwa

suplementasi masing-masing 10% FBS (*fetal bovine serum*), 10% EGS (*estrus goat serum*) dan 10% ESS (*estrus sheep serum*) dalam media maturasi menghasilkan angka maturasi oosit kambing masing-masing 83%, 86% dan 94% setelah dikultur selama 24-25 jam.

Hasil penelitian Jamil *et al.*, (2007), menunjukkan bahwa suplementasi *estrus buffalo serum* (EBS) dalam media TCM meningkatkan angka maturasi oosit kerbau dan pada oosit sapi (Rusell *et al.*, 2006). Menurut Kito dan Bavister (1997), adanya *estrus cow serum* (ECS) dalam media maturasi akan menstimulasi pecahnya *germinal vesicle* (GV) dan menginduksi maturasi oosit. Menurut Schelander (1990), bahwa ECS memberikan pengaruh yang baik terhadap angka maturasi oosit sapi karena mengandung LH yang relatif cukup tinggi. LH diketahui berperan dalam ekspansi *cumulus-oocyte complexes* (COCs) oosit, interaksi dan aktivasi proses maturasi (Saeki *et al.*, 1990 disitasi Quero *et al.*, 1999). Angka maturasi oosit yang dimaturasi dalam media yang mengandung gonadotrophin dan estradiol lebih tinggi dibanding media tanpa hormon (Abdoon *et al.*, 2001). Tatemoto & Terada (1998) melaporkan bahwa FSH menstimulasi dan mengatur mekanisme kondensasi chromatin untuk proses pembelahan miosis oosit, sedangkan LH dalam media maturasi akan menstimulasi ekspansi sel-sel kumulus (Gliedt *et al.*, 1996) sedangkan estradiol akan meningkatkan kemampuan fertilisasi oosit sapi yang dimaturasi *in vitro*. Menurut Akcay *et al.*, (2008) secara *in vivo* oosit akan istirahat pada fase profase (miosis I) dan akan mengalami proses pematangan kembali setelah dirangsang oleh interaksi antara hormon steroid, gonadotrophin dan berbagai konstituen cairan folikel. Karlach (1987) disitasi oleh Akcay *et al.*, (2008) mengatakan bahwa setelah oosit keluar dari antral folikel maka secara spontan akan mengalami pematangan, hal ini disebabkan karena hilangnya faktor penghambat maturasi yang terkandung dalam cairan folikel atau yang diproduksi oleh sel-sel kumulus melalui *gap junctions*. Adanya FSH dalam media maturasi akan merangsang sel-sel kumulus oosit untuk mensekresikan faktor pemicu terjadinya pembelahan miosis (Byskov *et al.*, 1997). FSH akan menstimulasi terjadinya peningkatan konsentrasi cAMP dan ekspansi sel-sel kumulus (Saeki *et al.*, 1991 disitasi Akcay *et al.*, 2008).

SIMPULAN

Tingkat pematangan inti oosit domba lebih banyak terhenti pada tahap metafase-I (M-I) dalam media yang disuplementasi dengan SS. Suplementasi ESS dalam media maturasi nyata ($P < 0,05$) mempengaruhi persentase pematangan inti oosit domba. Suplementasi 20% ESS dalam media maturasi (CR1aa) adalah yang terbaik dengan rata-rata angka maturasi (M-II) sebesar 79,98%. Oleh sebab itu ESS dapat dipakai sebagai bahan suplementasi dalam media maturasi (CR1aa) pada proses IVM oosit domba.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdoon, A., Kandil, O & O.T. Suzuki. 2001. Influence of oocyte quality, culture media and gonadotrophins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo emryos. *Anim. Reprod. Sci* 65: 215-223.
- Akcay. E., Oysal, O., Yavas, I & U. An. 2008. The effects of serum, steroid and gonadotrophins on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *J. Anim. And Vet. Advances* 7: 178-183.
- Boediono, A., Rusyantono, Y., Kusdiantoro, M., Djuwita, I & Herliatien. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *In vitro*. *Media Vet.* 7: 11-17.
- Butler, M. 1996. The basic animal culture and technology. New York: IRL Press.
- Byskov. A.G., Andersen, C.Y., Hossani, A & X. Guoliang. 1997. cumulus cells of oocytes-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 296-305.
- Ciptadi, G., Djati, S., Fatchiyah, M., Wahyuningsih, S., Isnaini, N & A. Sadiyah. 1999. Profil transformasi kromosom oosit kambing peranakan etawah pada sistem kultur *in vitro*. Abstrak. Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia, Forum Komunikasi Reproduksi. Malang 3-4 Desember 1999.
- Gaspersz, V. 1994. Metode Perancangan percobaan. Bandung: Armico.

- Gliedt, D.W., Rosenkraus, J.F., Rprrie, R.W., Munyon, A.L., Pierson, J.N., Miller, G.F & J.M. Rakes. 1996. Effects of media, serum, oviductal cells and hormones during maturation on bovine embryo development *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 79: 536-542.
- Gordon, I. 1994. Laboratory production of cattle embryos. Ireland: Cab International.
- Jamil, H., Samad, H.A., Rehman, N.U., Qureshi, Z.I & L.A. Lodhi. 2007. *In vitro* maturation and fertilization of riverine buffalo follicular oocytes in media supplemented with oestrus buffalo serum and hormones. *Acta Vet. Brno* 76: 399-404.
- Kito, S & B.D. Bavister. 1997. Gonadotrophins, serum and amino acids after nuclear maturation, cumulus expansion and oocyte morphology in hamster cumulus oocyte complexes *In vitro*. *Biol. Reprod* 56: 1282-1289.
- Langendonck, A.V., Donnay, I., Schuurbiens, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A & F. Dessy. 1997. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J. Reprod. and Fertil.* 109: 87-93.
- Lorenzo, P.L., Illera, J.C., Silvan, G., Illera, M.J., Munro, C.J & M. Illera. 1997. Determination by EIA of progesteron and 17 β -estradiol in culture medium from rabbit oocytes matured *in vitro* with epidermal growth factor. *Theriogenology*, 47: 192.
- Motlagh, M.K., Shahneh, A.Z., Daliri, M., Kohram, H & F. Gharagozlou. 2008. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different concentrations of mare serum. *African J. Biotech.* Vol. 7: 3380-3382.
- Nava, G.H & H. Tajik. 2000. *In vitro* maturation of ovine follicular oocytes in different concentrations of fetal calf serum and estrous sheep serum. *Theriogenology* 53: 435.
- Pawshe, C.H., Totey, S.M & S.K. Jain. 1994. A Comparison of Three Methods of Recovery of Goat Oocytes for *In Vitro* Maturation and Fertilization. *Theriogenology* 42:117-125.
- Quero, O.J.M., Milan, M.M., Merlinm, M.P., Mariscal, A.O & A.R. Franganillo. 1999. *In vitro* Embryos Production: Influence Of Serum and Hormonal Supplementation. *Arch Zootec.* 48: 71-74.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B & W. Khadijah. 2007. Goat Embryo Development From *In vitro* Matured Oocytes of Heterogenous Quality Trough Intracytoplasmic Sperm Injection Techniques. *Biotechnology* 6: 373- 382.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B & W.E.W. Khadijah. 2008. *In vitro* Maturation of Oocytes With Special Referebce To Goat: A. Review. *Biotechnology* 7: 599-611.
- Rao, B.S., Naidu, K.S., Amarnoth, D., Vagdevi, R., Rao,A.S., Brahmaiah, K.V & V.H. Rao. 2002. *In Vitro* Maturation of Sheep Oocytes In Different Media During Breeding and Non-Breeding Seasons. *Small Ruminant Research*, 43; 31-36.
- Rho, G.J., Hahnel, A.C & K.J. Betteridge. 2001. Comparisons of Oocytes Maturation Times and of Three Methods of Sperm Preparation for Their Effects on The Production of Goat Embryos *In vitro*. *Theriogenology* 56: 503-516.
- Rusiyantono, Y., Djuwita, I., Purwantara, B & 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.
- Rusiyantono, Y. 2001. Pemakaian Medium CR1aa Untuk Produksi Embrio Kambing *In Vitro* dan Upaya Kriopreservasi Dengan Metode *Vitrifikasi*. [Desertasi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Russel, D.F., Baqir, S., Bordignon, J & D.H. Betts. 2006. The Impact of Oocyte Maturation Media on Early Bovine Embryonic Development. *Mol. Reprod. Develop.* 73: 1255-1270.
- Sharma, G.T., Teotia, A & A.C. Majumdar. 2001. Meiotic competence of caprine oocytes during *ivm* on granulosa cell monolayers developed from small and large follicles in

- comparison to the granulosa cell coculture. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 14: 777-784.
- Schellander, K., Fuhrer, F., Brackett, B.G., Korb, B & W. Schleger. 1990. *In Vitro* Fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.
- Tajik, P & N.S. Esfandabadi. 2003. *In vitro* maturation of caprine oocytes in different culture media. *Small Rum. Res.* 47: 155-158.
- Tatemoto, H & T. Terada. 1998. Involvement of cumulus cells stimulated by fsh in chromatin condensation and activation maturation promoting factor in bovine oocytes. *Theriogenology* 49: 1007-1020.
- Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z & S. Salahudin. 2000. Effect of oocyte harvesting technique on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Rumin.* 36: 63-67.
- Wang, Z.G., Xu, Z.R & S.D. Yu. 2007. Effects of oocytes collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in boer goat. *Czech J. Anim. Sci.* 52: 21-25.
- Wattimena, J. 2004. Pengaruh Suplementasi Jenis dan Konsentrasi Serum Terhadap Produksi Embrio Domba Secara *In Vitro*. [Disertasi]. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Wattimena, J. 2006. Pengaruh serum domba estrus dan serum domba bunting terhadap produksi embrio domba *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner.* 11: 116-122
- Younis, A.I., Brackett, B.G & R.A.F. Hosken. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Research*, 23: 189-201.
- Zeng, Y.S. & M.A. Sirard. 1992. the effect of sera, bovine serum albumin and follicular cells on *in vitro* maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 37: 779-790.