

Pengaruh Keberadaan Corpus Luteum terhadap Kualitas dan Tingkat Maturasi Oosit Domba Lokal Umur Pubertas Awal Secara *In Vitro*

(Effect of the presence of corpus luteum on oocytes quality and in vitro maturation rate of local ewes at early puberty)

Rini Widyastuti^{1,2}, Mas Rizky Anggun Adipurna Syamsunarno³, Alvin Yusuf¹,
M. Rosyid Ridlo⁴, dan Sigit Prastowo⁵

¹Laboratorium Reproduksi dan Inseminasi Buatan, Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran

²Program Studi Kedokteran Hewan, Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

³Divisi Biokimia dan Biomolekuler, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar,
Fakultas Kedokteran, Universitas Padjadjaran

⁴Program Studi Kesehatan Hewan, Departemen Teknologi Hayati dan Veteriner,
Sekolah Vokasi, Universitas Gajah Mada

⁵Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret

ABSTRAK Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh keberadaan *corpus luteum* (CL) pada ovarium domba umur pubertas awal terhadap kualitas oosit hasil koleksi dan tingkat maturasinya secara in vitro (IVM). Sebanyak 279 oosit digunakan, terbagi pada kelompok tanpa CL (CL-) sebanyak 143 dan dengan CL (CL+) sebanyak 136. Oosit dipilih berdasarkan homogenitas sitoplasma dan dikelompokkan sesuai jumlah lapisan sel kumulus yaitu grade 1 (>4 lapis), grade 2 (3-4 lapis) dan grade 3 (0-2 lapis). Media IVM menggunakan *Tissue Culture Media 199* ditambah antibiotik, *Follicle Stimulating Hormone*, dan 10% *Fetal Bovine Serum*. Maturasi dilakukan

pada inkubator 38,5°C, 5% CO₂ selama 24 jam. Pasca IVM, tingkat kematangan oosit dievaluasi berdasar kemunculan *Polar Body I* (PB I). Hasil menunjukkan bahwa keberadaan CL tidak berpengaruh terhadap kualitas oosit yang dikoleksi pada semua grade. Keberadaan CL berpengaruh pada tingkat kematangan oosit pada grade 1 sebesar 48,64% dibandingkan CL- sebesar 47,19% (p<0,05). Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa keberadaan CL berpengaruh pada tingkat kematangan oosit setelah IVM. Hasil penelitian menggambarkan potensi penggunaan oosit ternak umur pubertas awal untuk digunakan lebih lanjut dalam program produksi embrio secara *in vitro*.

Kata kunci: Corpus luteum, pubertas awal, kualitas oosit, tingkat kematangan oosit

ABSTRACT This study aims to know effect of presence of corpus luteum (CL) to collected oocytes quality and its maturation rate post in vitro maturation (IVM), on local ewes ovary at early puberty. In total 279 oocytes were collected, 143 without CL (CL-) and 136 with CL present (CL+). Oocytes were selected according to sitoplasma homogeneity, divided into 3 grades according to cumulus cell (CC) layer namely Grade 1, 2 and 3 indicated by >4, 3-4, and 0-2 CC layers, respectively. The IVM media was *Tissue Culture Media 199* supplemented with antibiotic, *Follicle Stimulating Hormone*, and 10% *Fetal Bovine*

Serum following culture at 38.5°C and 5% CO₂. Twenty four hours post IVM, oocytes were evaluated on the presence of *Polar Body I*. Result showed that oocytes quality were not different among group in all grades. The present of CL gives better maturation rate in grade 1 compared to CL- (48.64 vs 47.19%; p<0.05). The present finding show that the presence of CL improves oocytes maturation rate post IVM. Moreover, this study shows the potency of using oocytes from ewes ovary at early puberty for further in vitro embryo production program.

Keywords: Corpus luteum, early puberty, oocyte quality, oocyte maturation rate

2018 Agripet: Vol (18) No. 2 : 83-89

PENDAHULUAN

Kegemaran sebagian masyarakat di Indonesia untuk mengkonsumsi daging domba muda menyebabkan sejumlah rumah potong

hewan memotong domba jantan atau betina berumur kurang lebih 7 bulan (Suharto dan Layla, 2005). Terkhusus pada domba betina, umur kurang lebih 6-8 bulan telah mencapai dewasa kelamin tetapi belum mencapai dewasa tubuh (Ngadiyono *et al.*, 2009). Umur tersebut dapat disebut juga sebagai pubertas awal yang

Corresponding author: prastowo@staff.uns.ac.id
DOI: <https://doi.org/10.17969/agripet.v18i2.12103>

ditandai dengan telah terjadinya perkembangan folikel dan terbentuk folikel antral pada ovarium (Senger, 2005). Ovarium yang diperoleh dari domba umur muda dapat digunakan sumber oosit untuk produksi embrio secara *in vitro*, dalam hal ini oosit yang diperoleh memiliki potensi untuk berkembang menjadi oosit yang matang (Hafez and Hafez, 2000; Senger, 2005).

Kualitas oosit yang dikoleksi dan proses pematangannya secara *in vitro* (maturasi *in vitro*) menjadi salah satu kunci awal yang menentukan keberhasilan perkembangan embrio pada tahap selanjutnya. Kualitas dan tingkat kompetensi oosit ternak muda memiliki perbedaan dibandingkan dengan ternak dewasa (Palmerini *et al.*, 2014). Pada ternak dewasa, oosit memiliki tingkat kompetensi lebih baik dibandingkan umur muda, hal ini terkait dengan mekanisme hormonal ternak dewasa dan telah berkembangnya ultra struktur oosit secara sempurna (Hyttel' *et al.*, 1997). Secara morfologis folikel yang diperoleh dari ternak muda memiliki ukuran lebih kecil dibandingkan ternak dewasa (Revel *et al.*, 1995), namun kemampuannya untuk dapat dimatangkan secara *in vitro* tidak berbeda (Hafid *et al.*, 2017) bahkan mampu menghasilkan embrio sampai pada tahap blastosis (O'Brien *et al.*, 1997). Hal ini menunjukkan bahwa oosit dari ternak muda memiliki potensi yang sama dengan domba dewasa untuk digunakan pada produksi embrio secara *in vitro*.

Disisi lain, kualitas dan kompetensi oosit juga ditentukan oleh keberadaan CL selama fase luteal pada perkembangan ovarium. Fase luteal berasosiasi dengan produksi hormon progesteron yang digunakan untuk mendukung kebuntingan ternak (Hafez and Hafez, 2000). Sedangkan fase folikuler, tidak ada CL, merupakan fase berkembangnya folikel-folikel yang berisi oosit untuk selanjutnya masuk pada fase estrus dan diovulasikan (Senger, 2005). Keberadaan CL dapat digunakan sebagai indikasi perkembangan ovarium yang secara tidak langsung mengindikasikan jenis hormon yang berperan pada perkembangan oosit. Perbedaan hormon tersebut dapat memberikan perbedaan kualitas oosit yang dihasilkan yang

selanjutnya mempengaruhi perkembangan oosit dan embrio yang dihasilkan (Bagg *et al.*, 2007).

Kompetensi pertumbuhan oosit ternak muda memiliki banyak kekurangan dibanding yang berasal dari ternak dewasa (Bagg *et al.*, 2007). Hal tersebut berkaitan dengan fungsi endokrin, hormonal, fisiologis, dan ukuran folikel. Keberadaan CL pada ovarium merupakan salah satu indikator yang dapat digunakan untuk menentukan kualitas oosit dan perkembangannya secara *in vitro*. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh keberadaan CL pada ovarium domba muda (awal pubertas) terhadap kualitas dan tingkat maturasi oosit secara *in vitro*.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium, dengan materi penelitian ovarium yang berasal dari domba betina berumur 6-8 bulan. Domba betina tersebut telah mengalami estrus pertama kali, tetapi belum pernah dikawinkan.

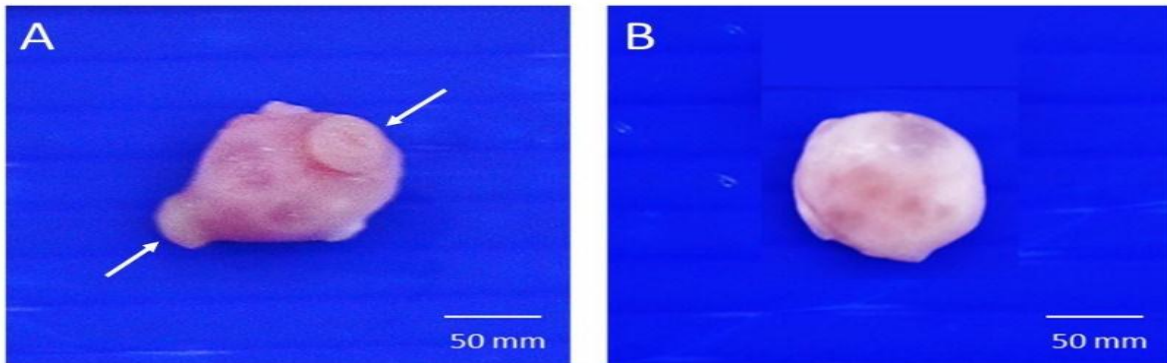
Koleksi Ovarium dan Koleksi Oosit Domba

Ovarium domba diperoleh dari rumah potong hewan (RPH) terdekat dan selanjutnya dibawa ke laboratorium dalam waktu 3-4 jam setelah ternak dipotong dalam larutan NaCl fisiologis yang ditambah antibiotik penisilin 100 IU/ml dan streptomisin 100 µg/ml dengan suhu berkisar 30-35°C. Sesampainya di laboratorium, ovarium dicuci menggunakan NaCl fisiologis sebanyak 3 kali. Ovarium yang diperoleh kemudian dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan status keberadaan CL yang dievaluasi secara visual (Gambar 1), yaitu tidak terdapat CL (CL-) dan terdapat CL (CL+).

Oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dalam media PBS (*Phosphate Buffer Saline*) yang ditambah *Fetal Bovine Serum* (FBS; Sigma, USA) sebanyak 5%. Oosit yang diperoleh dikelompokkan berdasar homogenitas sitoplasma dan sel-sel kumulus yang mengelilinginya. Grade 1 adalah oosit kumulus kompleks yang mempunyai lebih dari 4 lapis kumulus

dengan sitoplasma homogen, Grade 2 adalah oosit-kumulus kompleks dengan 3-4 lapisan kumulus dan sitoplasma homogen, dan Grade 3

adalah oosit dengan 0–2 lapis sel kumulus dan sitoplasma homogen (Widyastuti *et al.*, 2017a).



Gambar 1. Morfologi ovarium domba pubertas awal. A). Terdapat CL, dan B). Tanpa CL.(tanda panah = CL; bar = 50 mm).

Media Pematangan (Maturasi) Oosit Secara *In Vitro*

Media maturasi oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tissue Culture Media 199* (TCM 199) yang ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Sigma, USA) 0,01 mg/ml. Selanjutnya media maturasi disuplementasi dengan FBS sebanyak 10 % (Widyastuti *et al.*, 2017b). Oosit dikultur pada drop media maturasi sebanyak 100 µl dan berisi 10 oosit, kemudian ditutup dengan mineral oil. Kultur oosit kemudian dilakukan - pada inkubator bersuhu 38,5°C dengan konsentrasi CO₂ sebanyak 5% selama 24 jam (Prastowo *et al.*, 2016).

Evaluasi Kematangan Oosit

Dua puluh empat jam setelah maturasi, oosit selanjutnya dicuci pada media PBS yang ditambah FBS 5%. Sel kumulus yang berkembang selama proses maturasi *in vitro*, dihilangkan dengan metode pipetting dan tingkat kematangan oosit dievaluasi dengan melihat keberadaan *Polar Body I* (Winangun *et al.*, 2017).

Analisis data

Parameter yang diamati dalam penelitian ini adalah kualitas dan tingkat maturasi oosit setelah maturasi secara *in vitro* yang diperoleh dari ovarium domba pubertas awal dengan status CL+ dibandingkan CL-. Data tersebut

dianalisis secara statistik menggunakan *t-test* pada $\alpha=0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberadaan CL pada ovarium menandakan telah terjadi proses ovulasi, dalam hal ini ternak telah mengalami siklus ovarium dan siklus estrus (Gordon, 2003). *Corpus Luteum* juga menandakan bahwa ternak berada pada fase luteal dibawah pengaruh hormon progesteron (Hafez and Hafez, 2000; Senger, 2005). Keberadaan CL pada ovarium dapat menyebabkan perbedaan kualitas dan kompetensi oosit untuk dapat berkembang lebih lanjut. Dalam penelitian ini, kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium dengan status CL- dan CL+ dibedakan menurut homogenitas sitoplasma dan jumlah sel kumulus pada oosit (Gambar 2). Selanjutnya jumlah perolehan oosit dengan kualitas sesuai kriteria tersebut disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kualitas Oosit yang Diperoleh dari Domba Pubertas Awal

Status ovarium	Total oosit (n)	Grade		
		Grade 1	Grade 2	Grade 3
		----- n (%) -----		
CL-	143	51 (34,21)	49 (33,50)	43 (32,29)
CL+	136	51 (37,42)	45 (32,99)	40 (29,59)

Berdasarkan Tabel 1, kualitas oosit yang dihasilkan dari ovarium dengan status CL- dibandingkan CL+ tidak berbeda ($p>0,05$) pada setiap grade oosit. Hasil yang diperoleh dalam

penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya bahwa oosit yang dikoleksi dari ovarium tanpa CL memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan ovarium dengan CL (Kumar *et al.*, 2004). Perbedaan hasil tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan ukuran folikel pada ovarium. Pada ukuran folikel yang beragam, maka kualitas oosit akan cenderung memiliki kualitas yang berbeda pula (Bagg *et al.*, 2007). Pada sapi, domba, kambing dan babi, ukuran folikel yang besar menghasilkan oosit yang memiliki kualitas dan potensi untuk berkembang menjadi embrio yang lebih baik dibandingkan dengan oosit

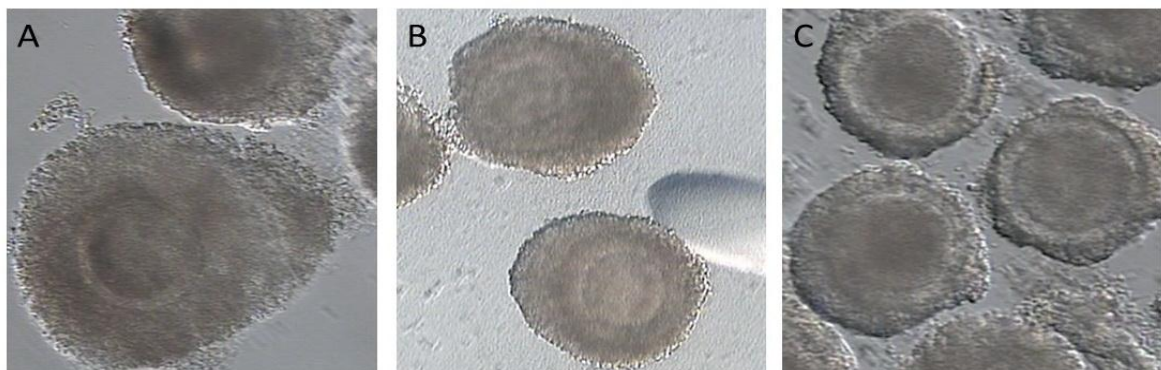
yang diperoleh dari folikel yang berukuran lebih kecil (Bagg *et al.*, 2007; Beker-van Woudenberg *et al.*, 2006).

Tingkat maturasi oosit yang dikoleksi dari ovarium dengan status CL- dan CL+ dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2. Observasi awal untuk menentukan kematangan oosit didasarkan pada evaluasi ekspansi sel kumulus (Gambar 3) pasca maturasi *in vitro* secara visual. Selanjutnya kematangan oosit ditentukan dengan melihat adanya Polar Body I setelah dilakukan penghilangan sel-sel kumulus (Gambar 4).

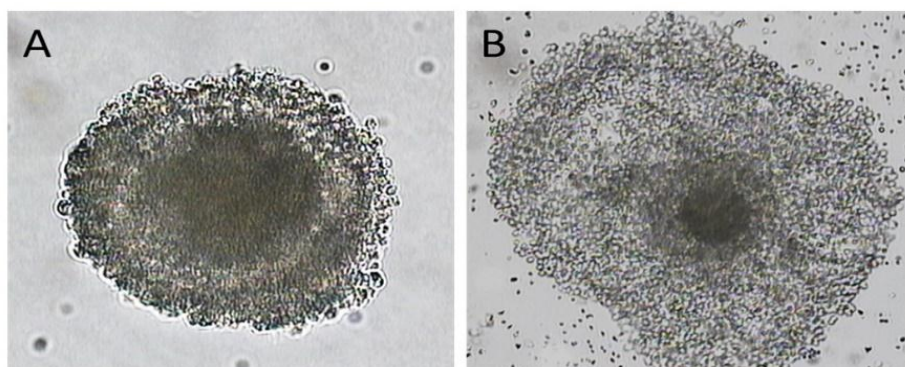
Tabel 2. Tingkat Kematangan Oosit *In Vitro* pada Domba Umur Pubertas Awal

Status ovarium	Jumlah oosit	Grade 1	Grade 2	Grade 3
		n (%)		
CL-	89	42 (47,19) ^a	31 (34,83)	16 (17,98)
CL+	74	36 (48,64) ^b	26 (35,13)	12 (16,22)

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



Gambar 2. Klasifikasi kualitas oosit berdasarkan kenampakan sel kumulus dan homogenitas sitoplasma. A). Grade 1 dengan lebih dari 4 lapis sel kumulus, B). Grade 2 dengan 2-3 lapis sel kumulus, C). Grade 3 dengan 0-1 lapis sel kumulus.



Gambar 3. Kondisi sel-sel kumulus setelah maturasi *in vitro* selama 24 jam. A). Tidak *expand*, B). *Expand*.



Gambar 4. Morfologi oosit setelah maturasi secara *in vitro* selama 24 jam. A). Oosit immatur, B). Oosit matur (ditunjukkan dengan adanya Polar Body I pada tanda panah), C). Oosit yang degenerasi atau tidak berkembang.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tingkat maturasi oosit yang berasal dari ovarium dengan status CL+ lebih tinggi secara nyata ($p < 0,05$) dibanding CL-, namun hasil ini hanya diperoleh pada oosit dengan kualitas grade 1, sementara pada grade 2 dan 3 tidak berbeda ($p > 0,05$). Hasil ini sejalan dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa keberadaan CL pada ovarium meningkatkan jumlah oosit yang matang setelah maturasi *in vitro* (Yoshizawa *et al.*, 2009; Žilaitis *et al.*, 2018). Dijelaskan bahwa CL menghasilkan progesteron, dan bersama dengan androgen mampu mencegah terjadinya atresia oosit. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa cairan folikel yang berasal dari ovarium dengan status CL+ memiliki kandungan progesterone yang lebih tinggi dibandingkan CL- pada hewan pra pubertas (Bagg *et al.*, 2007). Lebih lanjut disampaikan bahwa kombinasi antara kedua hormon tersebut dapat meningkatkan pematangan inti oosit (Borman *et al.*, 2004), sehingga meningkatkan jumlah oosit yang matang.

Salah satu hal yang mempengaruhi tingkat maturasi oosit *in vitro* adalah kualitas oosit yang dilihat dari keadaan sel kumulus (Kang *et al.*, 2012). Secara morfologis, kualitas oosit ditentukan oleh bentuk ultrastrukturalnya (Davachi *et al.*, 2012; Palmerini *et al.*, 2014). Pada umumnya, hewan yang sudah pubertas memiliki kualitas dan tingkat kematangan oosit lebih baik dibanding ternak pra pubertas (Steeves *et al.*, 1999), yang selanjutnya mengakibatkan perbedaan tingkat keberhasilan

fertilisasi (Hafid *et al.*, 2017) dan kemampuan oosit untuk mencapai fase embrional yaitu blastosis (O'Brien, 1996).

Sel kumulus merupakan faktor penting yang menentukan kualitas oosit (Broi *et al.*, 2018). Secara metabolis, sel kumulus menghasilkan metabolit yang mendukung pematangan sitoplasma dan inti (Alvarez *et al.*, 2009) melalui *gap junctions* yang menjadi pintu masuk metabolit ke dalam ooplasma. Lebih lanjut disampaikan bahwa sel-sel kumulus berinteraksi satu dengan yang lainnya untuk memproduksi antioksidan seperti *glutathione* (GSH) yang berperan dalam perkembangan oosit (Tanghe *et al.*, 2002). Dilaporkan juga bahwa sel kumulus berperan pada pematangan oosit secara *in vitro* melalui induksi pembelahan meiosis dan pematangan sitoplasma. Ketidakadaan atau kurangnya jumlah sel kumulus selama proses maturasi *in vitro*, dapat diasosiasikan dengan kurangnya jumlah metabolit yang membantu pematangan oosit. Hal inilah yang menjadi alasan, pada oosit grade 1 menghasilkan tingkat kematangan oosit yang lebih baik dibandingkan dengan grade yang lainnya.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa keberadaan CL pada ovarium domba umur pubertas awal tidak berpengaruh terhadap kualitas oosit yang dikoleksi, akan tetapi keberadaan CL meningkatkan jumlah oosit yang matang secara *in vitro*. Selanjutnya dapat dikatakan bahwa

oosit yang berasal dari ovarium domba pubertas awal memiliki potensi untuk digunakan kemudian pada produksi embrio *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez, G.M., Dalvit, G.C., Achi, M.V., Miguez, M.S., Cetica, P.D., 2009. Immature oocyte quality and maturational competence of porcine cumulus-oocyte complexes subpopulations. *Biocell*. 33(3): 167-177.
- Bagg, M.A., Nottle, M.B., Armstrong, D.T., Grupen, C.G., 2007. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. *Reprod. Fertil Dev*. 19(7): 797-803.
- Beker-van Woudenberg, A.R., Zeinstra, E.C., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., Bevers, M.M., 2006. Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: Effect of estradiol supplementation and follicle size. *Animal Reproduction Science*. 92(3-4): 231-240.
- Borman, S.M., Chaffin, C.L., Schwino, K.M., Stouffer, R.L., Zelinski-Wooten, M.B., 2004. Progesterone promotes oocyte maturation, but not ovulation, in nonhuman primate follicles without a gonadotropin surge. *Biol. Reprod*. 71(1): 366-373.
- Broi, M.G., DaGiorgi, V.S.I., Wang, F., Keefe, D.L., Albertini, D., Navarro, P.A., 2018. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *J Assist. Reprod. Genet*. 35(5): 735-751.
- Davachi, N.D., Kohram, H., Zainoaldini, S., 2012. Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research*. 102(1): 37-42.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B., 2000. *Reproduction in Farm Animal*, 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia. USA.
- Hafid, A., Karja, N., Setiadi, M., 2017. Kompetensi maturasi dan fertilisasi oosit domba prapubertas secara *in vitro* (Developmental competence of maturation and fertilization prepubertal sheep oocytes *in vitro*). *Jurnal Veteriner*. 18(1): 51-58.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T., 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*. 47(1): 23-32.
- Kang, J.T., Atikuzzaman, M., Kwon, D.K., Park, S.J., Kim, S.J., Moon, J.H., Koo, O.J., Jang, G., Lee, B.C., 2012. Developmental competence of porcine oocytes after *in vitro* maturation and *in vitro* culture under different oxygen concentrations. *Zygote*. 20:1-8.
- Kumar, N., Paramasivan, S., Sood, P., Singh, M., 2004. Micrometry of Different Category oocytes recovered from goat ovaries. *Indian J. Anim. Sci*. 74(3): 259-260.
- Ngadiyono, N., Ismaya, Budhi, S.P.S., Mulyadi, H., Andarwati, S., 2009. *Plasma Nutfah Ternak Domba di Indonesia*. Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- O'Brien, J.K., 1996. Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod. Fertil. Dev*. 8(7): 1029-1037.
- O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C., Evans, G., 1997. *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*. 47(7): 1433-1443.
- Palmerini, M.G., Nottola, S.A., Leoni, G.G., Succu, S., Borshi, X., Berlinguer, F., Naitana, S., Bekmukhambetov, Y., Macchiarelli, G., 2014. *In vitro* maturation is slowed in prepubertal lamb oocytes: ultrastructural evidences. *Reprod. Biol. Endocrinol*. 24(12): 115.

- Prastowo, S., Amin, A., Rings, F., Held, E., Wondim, D.S., Gad, A., Neuhoff, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K., Tesfaye, D., Hoelker, M., 2016. Fateful triad of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction and lipid accumulation is associated with expression outline of the AMP-activated protein kinase pathway in bovine blastocysts. *Reprod. Fertil. Dev.* 29: 890-905.
- Revel, F., Mermillod, P., Peynot, N., Renard, J.P., Heyman, Y., 1995. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *J. Reprod. Infertil.* 103(1): 115-120.
- Senger, P., 2005. *Pathway to Pregnancy and Parturition*, 2nd ed. Pullman, Washington. USA.
- Steeves, T.E., Gardner, D.K., Zuelke, K.A., Squires, T.S., Fry, R.C., 1999. In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. *Mol. Reprod. Dev.* 54(1): 49-56.
- Suharto, Z., Layla. 2005. Perbandingan karkas domba betina dan jantan umur potong tujuh bulan di pemotongan tradisional. *Prosiding Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian*. Pusat Perpustakaan dan Penyebaran Teknologi Pertanian. Badan Penelitian dan Pengembangan Kementerian Pertanian Republik Indonesia. Hal 131-134
- Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck, H., Coryn, M., De Kruif, A., 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 61(3): 414-424.
- Widyastuti, R., Khoirinaya, C., Ridlo, M.R., Syamsunarno, M.R.A.A., 2017a. Perbandingan viabilitas oosit pasca vitrifikasi pada dua tingkat konsentrasi sukrosa yang berbeda. *Majalah Kedokteran Bandung*. 49(4): 252-258.
- Widyastuti, R., Syamsunarno, M.R.A.A., Saili, T., Boediono, A., 2017b. Oocyte quality and subsequent in vitro maturation of sheep oocyte-cumulus complex from ovary with presence and absence of corpus luteum. *KnE Life Sciences* 3:166.
- Winangun, K., Widyastuti, R., Syamsunarno, M.R.A.A., 2017. Perbandingan viabilitas oosit domba pasca vitrifikasi dengan menggunakan hemistraw dan cryotop. *Agripet*. 17(2): 75-80.
- Yoshizawa, M., Watanabe, H., Fukui, Y. 2009. Effects of the presence and the numbers of corpora lutea in non-delivered and delivered pigs on in vitro oocyte maturation and embryonic development. *J. Reprod. Develop.* 55(6) :655-660.
- Žilaitis, V., Juodžentytė, R., Palubinskas, G., 2018. Relationship between corpus luteum and possibility dairy cows oocytes to maturation in vitro. *Vet. Med. Zoot.* 76(98): 119-121.