

Tingkat Kematangan Inti Oosit Sapi Setelah 24 Jam Presevasi Ovarium

(Nuclear maturity of bovine oocyte after 24 hours ovary preservation)

Rini Widyastuti¹ dan Siti Darodjah Rasad¹

¹Laboratorium Reproduksi Ternak dan Inseminasi Buatan Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran

ABSTRACT The objective of the research was to investigate their meiotic competence or nuclear maturity of bovine oocytes maturity *in vitro* after 24 hour preservation on 5°C. Oocytes were collected by slicing the ovaries in modified phosphate buffer saline (m-PBS). Selected cumulus-oocyte complexes (COCs) homogenous ooplasm were cultured in maturity medium at 38°C in humidified atmosphere of 5% CO₂ incubator. After 24 hours,

oocytes stained for nuclear maturity's evaluation. The proportion of oocytes at metaphase II (MII) was significantly difference ($P < 0.05$) on oocytes that 24 hours preserved ($44.21 \pm 3.04\%$) vs oocytes from fresh ovary ($73.97 \pm 9.32\%$) ($P < 0.05$). These results indicated that 24 hour's preservation bovine's ovary on 5°C cause decreases of nuclear oocyte maturity.

Keywords : Ovary, cumulus-oocyte complexes, preservation, maturity

2015 Agripet : Vol (15) No.2 : 72-78

PENDAHULUAN

Peningkatan permintaan konsumsi daging sapi mendorong pesatnya perkembangan industri peternakan sapi potong. Salah satu upaya untuk mengatasi penurunan populasi sapi potong adalah dengan menerapkan program percepatan difusi dan pemanfaatan inovasi teknologi reproduksi, yaitu dengan memperpendek selang beranak melalui manipulasi berahi, superovulasi, dan peningkatan jumlah anak jantan yang dilahirkan menggunakan semen hasil sex separasi. Hasil sex separasi tersebut telah mengakibatkan pergeseran anak yang dilahirkan kembar, serta terjadi peningkatan efisiensi reproduksi induk sapi (Sumaryadi *et al.*, 2010). Selain teknologi reproduksi di atas, alternatif teknologi yang dapat diaplikasikan untuk meningkatkan populasi sapi potong adalah dengan *In Vitro Fertilization* (IVF).

Teknologi IVF terdiri atas serangkaian kegiatan yang meliputi pematangan oosit, fertilisasi oosit dengan spermatozoa dan kultur embrio. Produksi embrio secara *in vitro* telah banyak dilakukan pada berbagai spesies ternak seperti sapi (Boediono *et al.*, 2003), kerbau

(Totey *et al.*, 1993), domba (Syaiful *et al.*, 2011), kambing (Pawshe *et al.*, 1994) kucing, anjing dan cheetah (Beveridge dan Jabtour, 1998). Produksi embrio melalui IVF dapat menggunakan oosit yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH) maupun dari hewan hidup yang diperoleh melalui teknik *Ovum Pick-Up* (OPU) dengan bantuan *ultrasonografi* (Ptak *et al.*, 1999 dan Kochhar *et al.*, 2002). Dalam pemanfaatan oosit yang berasal dari RPH, belum semua potensi termanfaatkan karena tempat pemotongan yang berjauhan dengan lokasi laboratorium dan teknologi yang mendukung belum memadai. Kondisi tersebut menyebabkan sumber material genetik tidak dapat diselamatkan. Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menyelamatkan material genetik tersebut adalah dengan melakukan preservasi. Preservasi diperlukan pada saat transportasi, sehingga kerusakan oosit yang disebabkan oleh kendala jarak dan waktu dapat diminimalkan. Pengaturan suhu, waktu dan media preservasi menjadi faktor untuk mendukung upaya tersebut.

Teknik preservasi jangka pendek telah dilakukan pada kambing (Silva *et al.*, 2003), domba (Yulnawati *et al.*, 2006), anjing (Lopes, 2008) dan sapi (Ackay *et al.*, 2008). Teknik ini mudah dilakukan karena hanya membutuhkan

Corresponding author : widyastuti25@gmail.com
DOI: <http://dx.doi.org/10.17969/agripet.v15i2.2417>

larutan fisiologis seperti NaCl fisiologis atau *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Eriani *et al*, 2013). Namun demikian, penelitian tentang pengaruh lama preservasi dan tingkat kematangan pada oosit sapi belum banyak dilakukan. Pematangan oosit mempunyai fungsi yang sangat penting bagi keberhasilan IVF. Pematangan oosit untuk menghasilkan oosit sekunder haploid yang memiliki komponen sel yang diperlukan dalam proses fertilisasi dan perkembangan embrio. Pematangan oosit meliputi pematangan inti dan pematangan sitoplasma. Selama pematangan oosit, struktur kromatin dalam oosit yang tidak matang melewati suatu proses penyusunan morfologi yang dimulai pada profase pembelahan meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase kedua.

Berdasarkan hal tersebut, maka pada percobaan ini dilakukan preservasi ovarium di dalam larutan NaCl fisiologis selama 24 jam dalam suhu 5°C untuk melihat kemampuan ovarium dalam mempertahankan daya hidup oosit yang ditunjukkan dengan tingkat kematangan pasca *In Vitro Maturation* (IVM). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan tingkat kematangan antara oosit yang berasal dari ovarium yang telah dipreservasi dengan oosit yang berasal dari ovarium segar. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi referensi preservasi jangka pendek untuk ovarium sapi dan dapat memberikan sumbangan informasi bagi pengembangan teknologi reproduksi untuk meningkatkan efisiensi biologis sapi yang sudah di potong di Rumah Potong Hewan (RPH).

MATERI DAN METODE

Media koleksi ovarium, oosit dan Pematangan *in vitro*

Media koleksi adalah NaCl fisiologis ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml. Media koleksi oosit adalah *Modified Phosphate Buffered Saline* (mPBS). Media matangasi adalah *Tissue Culture Media 199* (TCM 199) ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml dan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) (Sigma, USA)

0,01 mg/ml. Media pematangan disuplementasi dengan *Fetal Bovine Serum* (FBS) 10 %, Sigma, USA.

Koleksi ovarium dan koleksi oosit

Ovarium sapi yang diperoleh dari RPH lokal disimpan dalam termos dengan media koleksi (NaCl fisiologis) suhu 30-35°C. Ovarium yang diperoleh dibagi menjadi dua bagian yang sama. Kelompok ovarium pertama digunakan untuk perlakuan tanpa preservasi, sedangkan kelompok ovarium kedua digunakan untuk perlakuan preservasi selama 24 jam. Pada kelompok pertama, ovarium dicuci dengan media koleksi, oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dan dicuci 3 kali, pencucian terakhir dengan media pematangan TCM 199. Untuk perlakuan preservasi, setelah disimpan selama 24 jam pada suhu 4°C ovarium dicuci dengan media koleksi. Selanjutnya oosit dikoleksi dengan cara yang sama seperti di atas dan hanya oosit dengan sitoplasma homogen yang digunakan sebagai objek penelitian.

Pematangan oosit

Oosit dicuci sebanyak 3 kali dengan media dPBS kemudian oosit dipindahkan ke dalam 100 µL drop media pematangan yang dibuat pada *petridish* steril lalu ditutup dengan mineral oil. Setiap drop media pematangan berisi sekitar yaitu 10-15 oosit. Selanjutnya oosit diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 38,5°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%.

Evaluasi hasil kematangan oosit

Evaluasi hasil kematangan oosit dilakukan dengan metode pewarnaan aceto-orcein 2%. Oosit yang telah dimatangkan, dilepaskan dari sel-sel kumulus yang mengelilinginya dengan menggunakan *enzyme hyaluronidase* 0,25%. Oosit yang telah bebas dari sel kumulus diletakkan pada drop *Kalium Chloride* (KCl) 0,90% di atas kaca objek, lalu difiksir dengan kaca penutup yang memiliki bantalan paraffin dan vaselin (1:9) pada keempat sudutnya. Gelas obyek yang berisi oosit tersebut dimasukkan ke dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan

ethanol (1:3) selama 3-4 hari. Satu jam sebelum diwarnai, gelas obyek yang berisi oosit direndam terlebih dahulu dalam larutan ethanol absolut. Setelah itu oosit diwarnai dengan pewarnaan aceto-orcein 2% selama lima menit. Larutan pewarna dibersihkan dengan asam asetat 25% dan keempat sisi gelas penutup dilapisi cairan kuteks bening untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi inti dengan menggunakan mikroskop fase kontras. Evaluasi tingkat kematangan inti yang diamati pada penelitian ini adalah dengan cara menghitung jumlah oosit pada setiap pembelahan meiosis mulai dari *Germinal Vesicle* (GV), *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), *Metafase I* (M-I) dan *Metafase-II* (M-II).

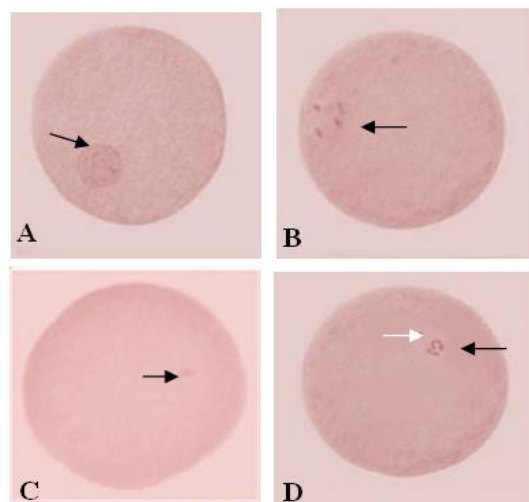
Analisis data

Penelitian menggunakan metode eksperimen laboratorium. Perlakuan yang dicobakan adalah preservasi selama 24 jam dan tanpa preservasi. Parameter yang diamati adalah: tingkat kematangan inti oosit yang terdiri dari tahap GV, GVBD, M-I dan M-II. Data dianalisis dengan menggunakan *Chi-Square*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Oosit yang diperoleh dari folikel sapi yang berasal dari RPH merupakan oosit yang belum mencapai tingkat kematangan dan belum siap untuk difertilisasi. Oleh karena itu, oosit tersebut harus dimatangkan secara *in vitro* sebelum dilakukan proses IVF. Pematangan ini meliputi berbagai perubahan kronologi tahapan meiosis (Gordon, 2003). Proses pematangan inti berhubungan dengan aktivitas sintesis RNA, ditandai dengan perubahan inti dari fase diploten ke MII. Membran inti akan mengadakan penyatuan dengan *vesicle* membentuk GV dan kemudian akan mengalami pelepasan membran inti membentuk GVBD. Setelah GVBD terjadi, kromosom dibungkus oleh mikrotubulus dan mikrofilamen yang sangat mempengaruhi keberhasilan pembelahan meiosis. Oosit yang telah mengalami GVBD selanjutnya akan mencapai tahap MI (Chohan and Hunter,

2003). Oosit yang berada pada tahap MII merupakan oosit yang telah matang dan siap untuk dilakukan fertilisasi. Gambaran selengkapnya mengenai tingkat kematangan inti oosit dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Status inti oosit setelah matang *in vitro*. Tanda panah menunjukkan status inti pada tahap: A. GV (*Germinal Vesicle*), B. GVBD (*Germinal Vesicle Break Down*), C. M-I (*Metafase I*), D. M-II (*Metafase II*). Perbesaran 400x. (Khatun *et al.*, 2011 dan Masudul Hoque *et al.*, 2012 dengan modifikasi)

Hasil observasi tingkat kematangan oosit yang diperoleh dari ovarium hasil preservasi dan oosit yang diperoleh dari ovarium segar dapat diamati pada Tabel 1. Dalam percobaan ini, presentasi oosit yang mencapai tahap MII pada ovarium yang dipreservasi selama 24 jam lebih rendah apabila dibandingkan dengan oosit yang berasal dari ovarium segar. Sebagian besar oosit pada ovarium yang dipreservasi selama 24 jam tertahan pada tahap MI sebanyak 40% sedangkan pada oosit dalam ovarium segar hanya 24,66%. Untuk tahap GVBD, oosit dari ovarium yang dipreservasi sebanyak 11,58% dan oosit dari ovarium segar hanya 1,7%. Pada oosit yang berasal dari ovarium segar tidak ditemukan oosit yang berada pada tahap GV, sedangkan pada ovarium yang dipreservasi terdapat 2%. Oosit pada tahap GV, GVBD dan MI merupakan oosit yang belum matang dan belum siap untuk difertilisasi. Pada ovarium yang dipreservasi selama 24 jam, oosit yang mencapai tahap MII adalah 44,21% sedangkan pada kelompok ovarium segar mencapai 73,97%.

Berdasarkan Tabel I, dapat diamati bahwa sebagian besar oosit yang dikoleksi dari ovarium segar telah mencapai tahap MII yaitu 73,97 %. Hasil ini berbeda dengan laporan Margawati *et al.*, 2000 (64 %) dan Daoed *et al.*, 2013 (55,22%) yang juga menggunakan TCM 199 sebagai media pematangan oosit pada sapi. Setelah dimatangkan selama 22 jam dalam medium TCM 199, oosit yang matang sebanyak 64 %. Perbedaan hasil tersebut diduga karena perbedaan lamanya waktu yang digunakan untuk pematangan dan suplementasi hormon FSH dan LH yang digunakan. Zuelke *et al.* (1991) dalam Gordon 1994 menyatakan bahwa LH mempengaruhi

pematangan oosit sapi dengan cara mengubah distribusi kalsium dalam ooplasma dan bahwa gonadotropin menimbulkan peningkatan glikolisis, dikombinasikan dengan peningkatan oksidasi glukosa mitokondrial pada sel kumulus tertutup di oosit sapi. Pemaparan LH juga terbukti menghasilkan peningkatan metabolisme glutamin pada oosit. Adanya *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) dalam media pematangan akan merangsang sel-sel kumulus oosit untuk mensekresikan faktor pemicu terjadinya pembelahan meiosis (Byskov *et al.*, 1997).

Tabel 1. Tingkat Pematangan Inti Oosit Sapi setelah 24 jam *In Vitro* Maturasi

Perlakuan	Jumlah oosit	Persentase Tingkat Matangasi (%)				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
Preservasi 24 jam	95	2(2,11 ± 0,61 ^a %)	11(11,58 ± 2,17 ^a %)	38(40,00 ± 5,33 ^a %)	42(44,21 ± 3,04 ^a %)	54(73,97 ± 9,32 ^b %)
Ovarium segar	73	2(2,11 ± 0,61 ^a %)	1(1,7 ± 2,56 ^b %)	18(24,66 ± 2,37 ^b %)	54(73,97 ± 9,32 ^b %)	0(0,00 ± 0,00 ^b %)

Germinal Vesicle (GV), *Germinal Vesicle Break Down* (GVBD), MI (*Metafase I*), MII (*Metafase II*), Tidak teridentifikasi (TI)
Huruf berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P<0,05)

Pada kelompok perlakuan preservasi, oosit yang mencapai tahap MII hanya 44,21% dan sebagian besar tertahan pada tahap MI sebanyak 40,00 %. Rendahnya persentase oosit yang mencapai tahap MII pada perlakuan preservasi diduga akibat *menurunnya* kualitas oosit akibat perlakuan preservasi. Pada prinsipnya, preservasi bertujuan untuk menghambat metabolisme ovarium dengan harapan kualitas oosit masih dapat dipertahankan. Menurut Engcong dan Karja (2013) oosit masih dapat mempertahankan kualitasnya ketika disimpan pada suhu 4°C selama 8-10 jam. Pada penelitian ini, preservasi dilakukan selama 24 jam sehingga kemungkinan terlalu lama dan telah terjadi penumpukan asam laktat sebagai sisa hasil metabolisme. Penumpukan asam laktat akan memicu timbulnya senyawa *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang akan menyebabkan kerusakan pada mitokondria *Deoxyribo Nucleat Acid* (DNA), protein, lipid, berkurangnya level *Adhenosin Tri Phospate* (ATP) intraseluler, menurunnya rasio *Glutathione/ Glutathione Disulfide* (GSH/GSSG) dan meningkatnya Ca^{2+} *cytosolic*. Semua parameter tersebut berperan dalam menentukan dinamika keseimbangan mikrotubula dan mikrofilamen. Apabila

keseimbangan tersebut terganggu maka dapat memicu terjadinya kelainan pada sitoskeleton oosit atau embrio (Tarin, 1995). Salah satu gangguan pada sitoskeleton adalah terhambatnya ekstruksi *polar body* pertama sehingga oosit akan terhenti pada tahap MI dan tidak dapat mengalami pembelahan lebih lanjut. Secara *in vivo*, oosit akan istirahat pada fase profase (meiosis I) dan akan mengalami proses pematangan kembali setelah dirangsang oleh interaksi antara hormon steroid, gonadotropin dan berbagai konstituen cairan folikel (Akca *et al.*, 2008). Setelah oosit keluar dari antral folikel maka secara spontan akan mengalami pematangan, hal ini disebabkan karena hilangnya faktor penghambat pematangan yang terkandung dalam cairan folikel atau yang diproduksi oleh sel-sel kumulus melalui *gap junctions*. Secara *in vitro* oosit akan mengalami pertumbuhan yang optimal setelah keluar dari folikel dan ketika dikultur dalam media pematangan secara spontan akan mengalami pembelahan meiosis dan pematangan ooplasmik. Menurunnya kualitas oosit yang digunakan, kemungkinan juga dipengaruhi oleh media penyimpanan. Pada penelitian ini, media yang digunakan adalah NaCl fisiologis tanpa penambahan apapun. Pada kondisi tersebut, sel

akan memanfaatkan garam-garam yang terkandung dalam NaCl sebagai buffer untuk mempertahankan keadaan fisiologis tanpa mendapatkan nutrisi maupun antioksidan. Dengan demikian apabila disimpan terlalu lama, maka sel tidak mendapatkan nutrisi maupun antioksidan yang dapat melindungi dari kerusakan. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa pada folikel ovarium yang disimpan dengan suhu 5°C selama 24 jam disertai penambahan serum sebanyak 15% menunjukkan hasil tidak berbeda nyata terhadap perubahan morfologi kualitas oosit yang dihasilkan (Khillare, 2008). Serum yang ditambahkan mengandung unsur-unsur protein, polipeptida, asam lemak, mineral, berbagai macam asam amino, hormon dan faktor pertumbuhan untuk pematangan oosit (Herdis, 2000).

Pada Tabel 1 dapat dilihat bahwa persentase oosit tahap GVBD dan tahap GV yang diperoleh dari ovarium yang dipreservasi lebih tinggi dibandingkan dengan oosit yang diperoleh dari ovarium segar. Hal ini berkaitan dengan kompetensi dari oosit yang bersangkutan. Pada perlakuan preservasi, kemungkinan sebagian oosit telah mengalami kerusakan sehingga kompetensinya berkurang akibatnya oosit tidak dapat berkembang ke tahap lebih lanjut. Secara *in vivo*, pematangan oosit merupakan kulminasi dari pertumbuhan dan perkembangan folikel dalam waktu yang cukup panjang. Kapasitas oosit untuk mampu berkembang lebih lanjut disebut sebagai *oocyte developmental competence*. Proses ini sangat berkaitan erat dengan follikulogenesis dan perkembangan folikel yang sehat (Sutton *et al.*, 2003). Kompetensi oosit sangat dipengaruhi oleh ketepatan antara kematangan inti dan kematangan sitoplasma. Tahapan pematangan inti sel terdiri dari GVBD, penahanan meiosis, ekstruksi *polar body* pertama dan penahanan pada meiosis ke II. Semua tahapan ini sangat penting agar oosit tersebut dapat terfertilisasi (Marcus *et al.*, 2006). Kemungkinan lain yang menyebabkan oosit masih berada pada tahap GV dan GVBD adalah disebabkan oleh perbedaan ukuran folikel yang digunakan. Kemungkinan, folikel yang digunakan mempunyai ukuran dibawah 1,6 mm. Hal ini

seperti yang disampaikan oleh Leidfried Rutledge *et al.*, 1987 dalam Kusindarta, 2009) bahwa folikel dengan diameter 2 mm mengandung oosit yang sudah mengalami pertumbuhan secara penuh (telah mencapai stadium akhir profase meiosis pertama), sehingga apabila dimatangkan secara *in vitro* dapat melakukan pembelahan meiosis secara spontan. Oosit sapi yang berasal dari folikel dengan diameter kurang dari 1,6 mm belum menyelesaikan fase pertumbuhannya, sehingga belum mampu melakukan pembelahan meiosis pertama.

KESIMPULAN

Preservasi ovarium sapi pada suhu 5°C selama 24 jam mengakibatkan penurunan tingkat kematangan oosit.

DAFTAR PUSTAKA

- Akcay, E., Oysal, O., Yavas, I dan 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.
- Beveridge, D.R. and Jabtour, H.N., 1998. Potential of assisted technique for the conservation of endangered species in captive. *Veterinary Record*. 143: 159-168
- Boediono, A., Rusiyantono, Y and Godke, R.A., 2003. Development of *in vitro* produced caprine embryos cultured in different conditions. The 7nd Int. Meeting Biotech. Anim. Reprod. Kunming, China.
- Byskov, A.G., Andersen, C.Y., Hossani, A and Guoliang, X., 1997. Cumulus cells of oocytescumulus complexes secrete a meiosisactivating substance when stimulated with FSH. *Mol. Reprod. Dev.* 46: 296-305.
- Chohan, K.R., and Hunter A.G., 2003. Meiotic competence of bovine fetal oocytes following *in vitro* maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 76:43-51.

- Daoed, D.M., Nono, N., Diah, T.W., 2013. Pengaruh suplementasi fetal calf serum terhadap kemampuan maturasi in vitro oosit sapi. *Buletin Peternakan*. 37: 136-142.
- Engcong, D.M., dan Karja, N.W., 2013. Kualitas oosit domba dari ovarium setelah penyimpanan pada suhu dan periode waktu yang berbeda. *Acta Veterinaria Indonesiana*. 1:44-49.
- Eriani, K., Yuhara, S., Arief, B., Ita, D., Sony, H.S., 2013. Produksi embrio kucing secara in vitro dari spermatozoa hasil preservasi melalui fertilisasi mikro. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 7: 37-42.
- Gordon, I.R. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. CABI Publishing; Wallingford UK.
- Herdis., 2000. Pemanfaatan ovarium sebagai limbah rumah potong hewan untuk meningkatkan populasi ternak melalui teknik fertilisasi in vitro. *Deputi Bidang Teknologi Agroindustri dan Bioteknologi, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Jakarta*. 1-3.
- Khatun, M., Bhuiyan, M.M.U., Ahmed, J., Haque, A., Rahman, B.R., Shamsudin, M., 2011., In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black Bengal goat oocytes. *J Vet Sci*. 12: 75-82.
- Khillare, K.P., 2008. Recovery and preservation of goat follicular oocytes. *Veterinary World*. 1:3.
- Kochhar, H.P., Wu, B., Morris, L.H., Buckrell, B.C., Pollard, J.W., Basrur P.K and King, W.A., 2002. Matangation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod. Domes. Anim*. 37:19-25
- Leidfried-Rudledge, M.L., Crester, E.S., Eyestone, W.H., Northey, D.L and First, N.L., 1987. Development potential of bovine oocyte matangated in vivo or in vitro. *Biol. Reprod*. 36:376-383. *Dalam*
- Kusindarta, D.L., 2009. The effects of matangation time andduration of incubation fertilization on fertilization rate of ongole grade cattle oocyte in vitro. *J. Ked.Hewan*. 3:1.
- Lopez, A.P., Santo, R.R., Holland, J.J., Aline, C.M., Robert, P.M., Claudio, N.C., Campello, C., Roberto, J., Sonia, V.V., Jewgenew, N.B.K., Figuerido, J.R., 2008. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*. 114:201-214.
- Marcus, W., Jurema and Daniela., 2006. In vitro matangation of human oocytes for assisted reproduction. *Fertility and Sterility*. 86: 5.
- Margawati, E.M., Kaiin, K., Eriani, Yanthi, N.D., Indriawati., 2000. Pengaruh media IVM dan IVC pada perkembangan embrio sapi secara in vitro. *JITV*. 5:4
- Masudul Hoque, S.A., M.A.M. Yahia Khandoker., S.K. Kabiraj., L.Y. Asad., M. Fakruzzaman and K.M.A. Tareq., 2012. Effect goat follicular fluid on in vitro production of embryos in Black Bengal goats. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 2: 287-294.
- Pawshe, C.H., Totey, S.M., and Jain, S.K., 1994. A comparison of three methods of recovery of goat for *in vitro* matangation and fertilization. *Theriogenology*. 42:117- 125
- Ptak, G., Loi, P., Dattena, M., Tischner, M., and Cappai., 1999. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod*. 61:1568-1574.
- Silva, J.R.V., Alline., Regiane, R.D.S., Sonia H.F.C., Ana, P.R.R., Marcos, A..L.F., Vanessa, P.M., Jose, R.F., 2003. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciência Rural, Santa Maria*. 33:913-919.

- Sumaryadi, M.Y., Dadang, M.S., Budi, H., Dedi, H., Sudrajat., Chotim, A.Y. 2010. Kajian aspek reproduksi dan estimasi ekonomi pada ternak sapi yang di inovasi teknologi reproduksi. *Agripet*. 10:1-6.
- Sutton, M.L., Gilchrist, R.B and Thompson, J.G., 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*. 9:35-48.
- Syaiful, F.L., Saladin, Jaswandi., Udin, Z., 2011. Pengaruh waktu fertilisasi dan sistem inkubasi yang berbeda terhadap tingkat fertilisasi sapi lokal secara in vitro. *Jurnal Peternakan Indonesia*. 13:1
- Tarin, J.J., 1995. Aetiology of age-associated aneuploidy: a mechanism based on the 'free radical theory of ageing'. *Mol.Hum.Reprod.,I.Hum.Reprod.*10:1563-1565.
- Totey, S.M., Pawshe, C.H and Singh, G.P., 1993. *In vitro* matangation and fertilization of buffalo oocytes : effect of media hormon and sera. *Theriogenology*. 39: 1153-1171
- Yulnawati., Setiadidan, M.A and Boediono, A., 2006. Penggunaan medium CR1aa untuk produksi embrio domba in vitro. *JITV*.1: 2