

PENGARUH SUPLEMENTASI *FETAL CALF SERUM* TERHADAP KEMAMPUAN MATURASI *IN VITRO* OOSIT SAPI

EFFECT OF FETAL CALF SERUM SUPPLEMENTATION ON IN VITRO MATURATION ABILITY OF BOVINE OOCYTES

Denvy Meidian Daoed*, Nono Ngadiyono, dan Diah Tri Widayati

Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada, Jl. Fauna No. 3, Bulaksumur, Yogyakarta, 55281

INTISARI

Penelitian ini memanfaatkan hasil samping rumah potong hewan (RPH) sebagai sumber oosit untuk *in vitro fertilization* (IVF). Untuk meningkatkan keberhasilan IVF dilakukan suplementasi *fetal calf serum* (FCS) pada medium maturasi *in vitro*. Ovarium sapi dari RPH dibawa ke laboratorium dalam medium NaCl 0,9% pada suhu 31-34°C. Selanjutnya oosit diaspirasi menggunakan syringe 3 ml dan jarum 23 G yang berisi *Dulbecco's-Phosphate Buffer Saline* (DPBS), kemudian dimaturasikan pada inkubator CO₂ modifikasi dalam medium *Tissue Culture Medium-199* (TCM-199) (CO₂ 5%, kelembaban 99% dan suhu 37-39°C). Oosit dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kontrol (TCM-199) dan kelompok perlakuan (TCM-199 + 10% FCS). Angka maturasi dianalisa dengan *Chi-Square*, sedangkan kualitas oosit dianalisis secara deskriptif. Maturasi oosit sapi pada kelompok perlakuan berbeda nyata ($P \leq 0,05$) dibandingkan kelompok kontrol (55,22% vs 40,09%). Penggunaan 10% FCS pada medium maturasi dapat menghasilkan kualitas oosit matur yang lebih baik dibandingkan kelompok kontrol. Kesimpulan penelitian ini adalah penggunaan 10% FCS suplementasi dapat meningkatkan kemampuan maturasi oosit sapi *in vitro*.

(Kata kunci: *Fetal calf serum*, Kultur oosit, Maturasi *in vitro*, Oosit sapi)

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the utilization of ovaries from the slaughterhouse as oocytes source for in vitro fertilization (IVF). Fetal calf serum (FCS) was used as supplement of in-vitro maturation medium in order to increase the successfullness of IVF. Ovaries were collected from local slaughterhouse and transported to the laboratory using 0.9% NaCl medium at 31-34°C. The oocytes were aspirated by using a 3 ml syringe and 23 G needle containing Dulbecco's-Phosphate Buffer Saline (DPBS), then were matured in modified CO₂ incubator (99% humidity and a temperature of 37-39°C) in Tissue Culture Medium-199 (TCM-199). Oocytes were divided into 2 groups: control group (TCM-199) and the treatment group (TCM-199 + 10% FCS). Data was analyzed by Chi-Square analysis, and the quality of oocytes were analyzed descriptively. Maturation ability of bovine oocytes in the treatment group was significantly higher ($P \leq 0.05$) than the control group (55.22% vs 40.09%). In conclusion, the supplementation of 10% FCS in maturation medium improve the quality and ability of oocytes maturation.

(Key Words: *Fetal calf serum, Oocytes culture, In vitro maturation, Bovine oocytes*)

Pendahuluan

Perkembangan bioteknologi reproduksi ternak telah banyak menghasilkan manfaat bagi manusia khususnya dalam industri peternakan. Teknologi-teknologi tersebut antara lain adalah inseminasi buatan (IB) yang telah memasyarakat di daerah-daerah dan sudah membuahkan hasil (Rustanto dan Sugiono, 1997) dan transfer embrio (TE) yang saat ini masih dikembangkan dapat dilakukan untuk memperbanyak embrio. Untuk keperluan transfer embrio dibutuhkan embrio dalam jumlah yang banyak. Salah satu cara yang dapat dilakukan adalah dengan aplikasi teknologi *in vitro*

fertilization (IVF) meliputi *in vitro maturation* (IVM) dan *in vitro culture* (IVC).

Ovarium sapi yang berasal dari rumah potong hewan (RPH) sesaat setelah penyembelihan dapat dimanfaatkan sebagai sumber oosit untuk keperluan *in vitro* maturasi sehingga dapat memudahkan *in vitro* fertilisasi (Pujol *et al.*, 2004), namun keberhasilan IVF sampai ke tahap blastosist sangat tergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis suplemen yang digunakan dalam media maturasi *in vitro* (Hammam *et al.*, 2010), kualitas oosit yang digunakan (Lonergan *et al.*, 2003; Anguita *et al.*, 2007), serta resiko kontaminasi dan kondisi kultur (Sagirkaya *et al.*, 2007). Jenis suplemen, kualitas oosit serta kondisi kultur yang baik sangat mendukung untuk meningkatkan kemampuan maturasi oosit *in vitro*.

Optimalisasi maturasi *in vitro* oosit antara lain adalah pengklasifikasian oosit, penambahan zat

* Korespondensi (*corresponding author*):

Telp. +62 853 2812 3592

E-mail: denvy_md@yahoo.com

aditif berupa faktor pertumbuhan dan hormon (Shen *et al.*, 2008), maupun berbagai macam serum. Klasifikasi oosit yang didasarkan pada kelengkapan struktur oosit sangat mempengaruhi maturasi *in vitro* dan perkembangan oosit sampai ke tahap blastosist (Alm *et al.*, 2005; Ksiazkiewicz *et al.*, 2007). Penggunaan serum seperti *fetal calf serum* (FCS) banyak digunakan dalam produksi embrio (Sagirkaya *et al.*, 2004) karena mengandung *epidermal growth factor* (EGF) yang berperan sebagai regulator intraovarian dalam proses maturasi oosit (Mtango *et al.*, 2003). *Fetal calf serum* telah dibuktikan bermanfaat selama kultur *in vitro*, namun kadar penggunaannya dan hasil yang diperoleh masih bervariasi (Abe *et al.*, 2002; Holm *et al.*, 2002; Rizos *et al.*, 2002). Penelitian tentang pengaruh suplemen FCS terhadap kemampuan maturasi oosit sapi *in vitro* dilakukan dalam rangka untuk memanfaatkan hasil samping RPH dan sekaligus menambah referensi hasil IVF.

Materi dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai Desember 2012 di Laboratorium Fisiologi dan Reproduksi Ternak, Fakultas Peternakan, Universitas Gadjah Mada.

Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium sapi lokal hasil persilangan (sapi PO, sapi SimPO, dan sapi LimPO) sebagai sumber oosit yang diperoleh dari RPH Giwangan Yogyakarta, TCM-199, D-PBS, BSA, heparin, Naccaffein, Na-piruvat, NaCl fisiologis, Pen-Strep, FCS, minyak mineral dan aquabides steril. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah modifikasi Inkubator CO₂, cawan petri disposibel berdiameter 35 mm, syringe disposibel 3 ml, alat-alat gelas: pipet ukur, pipet pasteur, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas beker dan alat-alat gelas lainnya, *laminar air flow*, mikroskop *inverted*, kamera Optilab, mikropipet, termos, penangas air, dan filter Millipore.

Metode

Koleksi ovaria. Ovaria diambil dari RPH setelah sapi disembelih, kemudian dicuci dengan larutan NaCl 0,9% yang telah diberi penisilin G dan streptomisin sulfate, ditempatkan dalam termos yang berisi larutan (100 ml NaCl 0,9% + 100 IU/ml penisilin G + 10 mg/ml streptomisin sulfate) pada suhu 31-34°C. Ovaria dibawa ke laboratorium dalam waktu tidak lebih dari 3 jam.

Aspirasi dan pencarian oosit. Oosit diaspirasi menggunakan syringe 3 ml dan jarum 23

G yang berisi D-PBS + 3% FCS. Cairan yang diperoleh dari folikel ditampung dalam tabung yang terpisah, kemudian dilakukan pencarian oosit. Pencarian dan evaluasi oosit dilakukan dengan menuangkan cairan folikel pada cawan petri di bawah mikroskop stereo dengan pembesaran 10x.

Klasifikasi oosit. Oosit diklasifikasikan berdasarkan kelengkapan strukturnya dan diseleksi mengikuti Gordon (1994): kelas 1) lapisan sel kumulus utuh dan kompak, ooplasma rata dan tidak bergranula, kelas 2) lapisan kumulus tidak utuh (minimal setengah keliling oosit) dan ooplasma rata, kelas 3) oosit gundul tanpa lapisan kumulus, kelas 4) oosit dikelilingi oleh fibrin yang menyerupai sarang laba-laba. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini hanya oosit kelas 1 dan 2.

Maturasi oosit. Oosit yang diperoleh dipisahkan ke dalam 2 (dua) kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol diletakkan dalam media maturasi 100 ml TCM-199 (25 mM Hepes TCM-199 dengan garam Earle's) yang telah diberi antibiotik (Penisilin G 100 IU/ml dan streptomisin sulfate 10 mg/ml) tanpa FCS, sedang pada kelompok perlakuan oosit diletakkan dalam media maturasi yang sama dan diberi tambahan 10% FCS dari 100 ml TCM-199. Proses inkubasi dilakukan dengan menggunakan modifikasi inkubator CO₂. Oosit yang diletakkan pada media maturasi ditutup dengan minyak mineral kemudian petridishnya dimasukkan dalam kantong aluminium kedap udara, lalu melalui filter millipore 22 µm gas CO₂ dari saluran pernapasan ditiupkan dalam aluminium tersebut hingga plastiknya mengembang, segera ditutup dan dimasukkan dalam aluminium foil sehingga tidak tembus cahaya. Proses inkubasi dilakukan dengan memasukkan dalam inkubator pada suhu 39°C dan kelembaban 99% selama 22 jam.

Pengamatan. Oosit yang sudah dimaturasi *in vitro* selama 22 jam kemudian diamati dengan mikroskop stereo. Terjadinya maturasi ditandai dengan pemekaran sel-sel kumulus, zona pelusida terlihat semakin jelas, dan munculnya polar bodi pertama.

Analisis data

Variabel yang diamati meliputi persentase oosit yang matur dan kualitas oosit yang dapat dilihat dari pemekaran sel-sel kumulus dan terlihat jelasnya zona pelusida. Angka maturasi adalah jumlah oosit yang matur dibagi jumlah total oosit yang diinseminasi dikalikan seratus, sedangkan kualitas oosit adalah bentuk oosit yang proporsional yang diamati berdasarkan *grade*-nya. Data persentase oosit yang matur dianalisis secara

statistik menggunakan *Chi-Square* dan kualitas oosit dianalisis secara deskriptif.

Hasil dan Pembahasan

Maturasi oosit dapat diamati dengan dua cara yaitu maturasi sitoplasma yang ditandai oleh semakin transparannya zona pelusida oosit serta maturasi secara keseluruhan yang ditandai dengan ekspansi sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit. Hasil penelitian di laboratorium menunjukkan bahwa dalam kelompok perlakuan yang diberi penambahan FCS sebanyak 10% memperlihatkan jumlah oosit matur yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok kontrol yang tidak diberi FCS.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan FCS pada medium maturasi *in vitro* memperlihatkan pengaruh yang signifikan antara dua kelompok perlakuan. Hasil penelitian ini sama dengan hasil penelitian Sagirkaya *et al.* (2004) yang menunjukkan efektivitas penggunaan 10% FCS jika dibandingkan dengan serum lain dan atau tanpa serum. Hal ini disebabkan karena FCS merupakan serum fetus sapi yang banyak mengandung zat yang dibutuhkan oleh oosit selama proses kultur *in vitro*. Mucci *et al.* (2006) menyatakan bahwa FCS dapat menyediakan substrat energi, asam amino, vitamin, *growth factor* dan antioksidan. Zat-zat tersebut merupakan zat yang bermanfaat selama proses kultur *in vitro*. *Fetal calf serum* juga dapat bersifat sebagai *biosecurity* yang dapat menghambat resiko kontaminasi patogen selama kondisi kultur *in vitro* (Moore dan Bonilla, 2006).

Hasil analisis menunjukkan perbedaan yang nyata ($P \leq 0,05$) antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Persentase oosit matur pada kelompok perlakuan sebesar 55,22% lebih besar dibandingkan kelompok kontrol sebesar 40,09% (Tabel 1). Hasil ini hampir sama dengan yang diperoleh Rutledge *et al.* (1986) yang mendapatkan tingginya angka maturasi oosit pada penambahan 10% FCS dibandingkan dengan 20%, 5%, dan 1% secara berturut-turut.

Ciri yang paling menonjol dari oosit matur adalah ekspansi sel-sel kumulus serta semakin ter-

lihat jelas zona pelusida oosit. Secara *in vitro* ekspansi atau pemekaran sel-sel kumulus sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya medium dan kondisi kultur selama proses inkubasi (Wattimena, 2006), dan aktivitas berbagai komponen yang melibatkan enzim, dan hormon (Widayati, 1998), serta komposisi medium kultur yang digunakan (Tavares *et al.*, 2008).

Proses pengklasifikasian oosit juga sangat diperlukan sebelum maturasi *in vitro*, karena *grade* oosit ditentukan oleh kelengkapan struktur dari oosit tersebut. *Grade* oosit juga dapat mempengaruhi kualitas maturasi. Oosit dengan sel-sel kumulus yang intak (*grade* 1) dan dimaturasi dengan penambahan FCS akan menyebabkan kualitas maturasi yang lebih baik dibanding dengan oosit yang hanya memiliki sebagian sel-sel kumulus (*grade* 2) atau tanpa penambahan FCS pada medium maturasinya. Hal ini berkaitan dengan fungsi FCS yang dapat menyediakan protein bagi oosit selama proses maturasi. Gambar 1 menyajikan oosit *grade* 1 yang digunakan dalam penelitian.

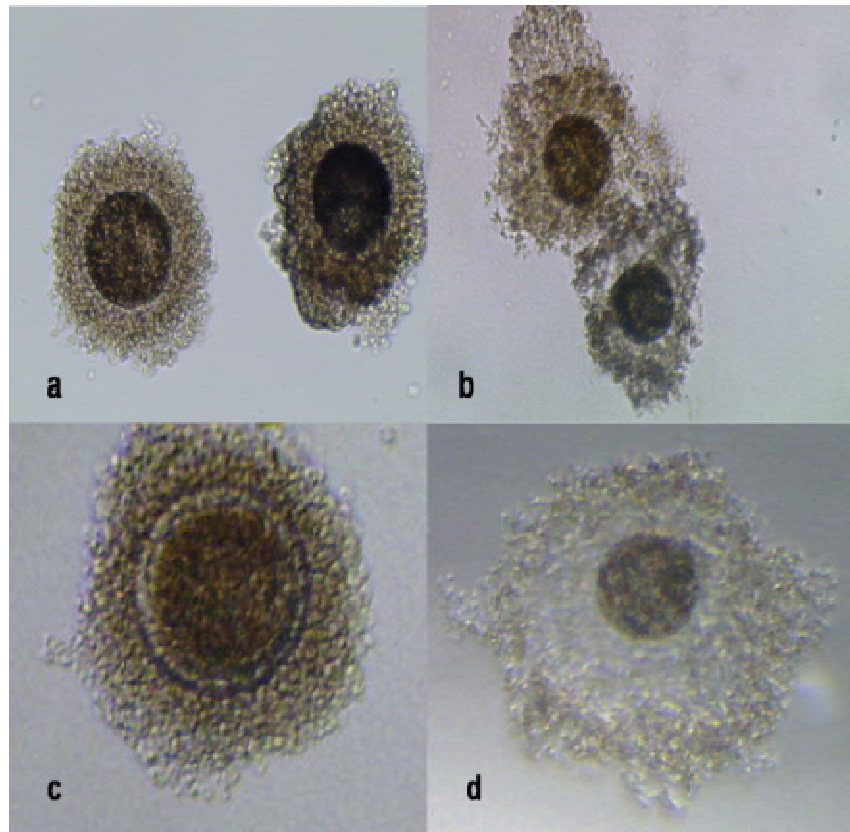
Dari Gambar 1 dapat dilihat perbedaan antara oosit yang dimaturasi dalam kelompok kontrol dan perlakuan. Oosit pada kelompok perlakuan mempunyai kualitas oosit matur lebih baik yang ditandai dengan struktur sel-sel kumulus dan nukleus yang lebih proporsional dibandingkan dengan oosit matur pada kelompok kontrol. Hal ini disebabkan oleh komponen FCS yang tidak terdapat pada kelompok kontrol. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Lorenzo *et al.* (1994) bahwa besarnya pengaruh FCS yang ditambahkan dalam medium maturasi *in vitro* pada kelompok oosit yang memiliki COCs, berkaitan dengan peran FCS yang sangat dibutuhkan oleh FSH yang membuat terjadinya ekspansi sel-sel kumulus, memperbaiki viabilitas sel, dan menyelesaikan pembelahan meiosis pertama.

Cumulus oocyte complexes (COCs) yang dimaturasi *in vitro* dalam medium maturasi yang disuplementasi *fetal calf serum* akan mengalami kemampuan perkembangan maturasi yang lebih baik dibandingkan dengan oosit yang memiliki sel-sel kumulus sebagian. Hal ini disebabkan selain

Tabel 1. Persentase oosit yang matur dari dua perlakuan setelah maturasi *in vitro* (*percentage of maturation oocytes in the two treatment groups after in vitro maturation*)

Kelompok (<i>group</i>)	Jumlah oosit yang diamati (<i>total oocytes observed</i>)	Jumlah oosit yang matur (<i>total oocytes mature</i>)
Perlakuan (+FCS 10%) (<i>experiment (with FCS 10%)</i>)	230	127 (55,22%) ^b
Kontrol (tanpa FCS) (<i>control (within FCS)</i>)	222	89 (40,09%) ^a

^{a,b} Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (*different superscripts at the same column indicate significant differences*).



Gambar 1. Oosit *grade 1* kelompok perlakuan (+FCS), (a) sebelum maturasi dan (b) setelah maturasi; serta oosit kelompok kontrol (tanpa FCS) (c) sebelum maturasi dan (d) setelah maturasi (*oocyte grade 1 experiment group (+FCS), (a) before maturation and (b) after maturation; oocyte control experiment (absence FCS) (c) before maturation and (d) after maturation.*

fungsi FCS yang menginaktifkan radikal bebas dan logam berat selama kondisi kultur (Sagirkaya *et al.*, 2004), sel-sel kumulus juga berperan dalam mekanisme kompleks yang melibatkan komunikasi intraseluler oosit dan sel-sel somatis selama proses maturasi (Zhu *et al.*, 2007).

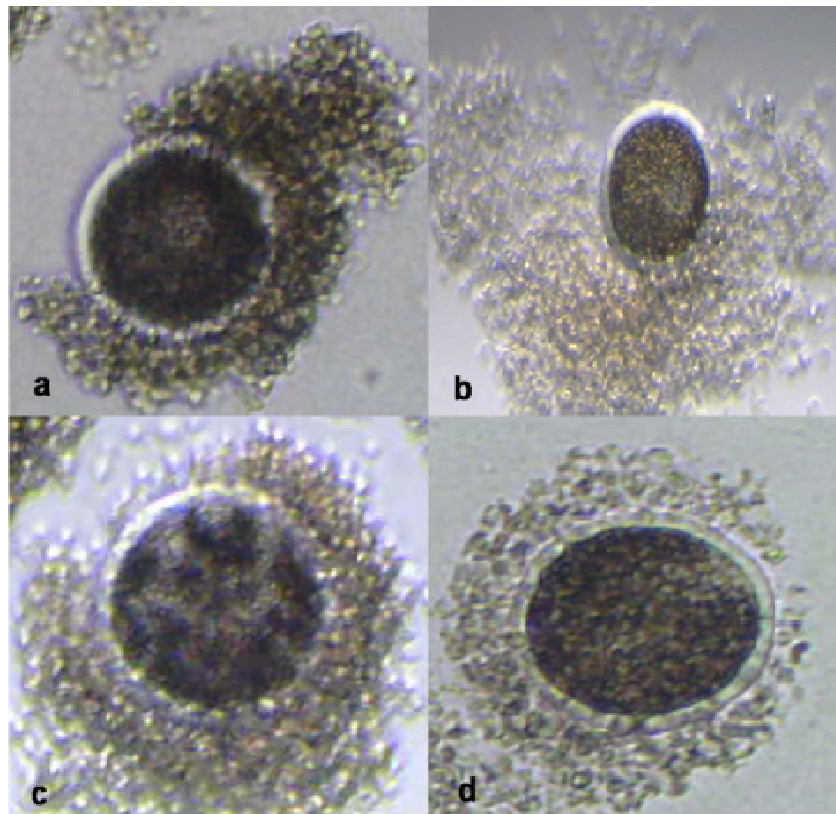
Kualitas oosit merupakan faktor yang sangat penting dalam menentukan maturasi oosit. Sama halnya dengan FCS yang dapat meningkatkan angka maturasi dibanding serum lainnya seperti *bovine serum albumin* (BSA) (Koo *et al.*, 1997) dan *synthetic serum substitute* (SSS) (Sagirkaya *et al.*, 2004). Oosit dengan sel-sel kumulus intak menyediakan faktor esensial selama proses maturasi, menjaga oosit dan berperan selama tahapan pembelahan meiosis serta mendukung maturasi sitoplasma. Pada babi oosit sel-sel kumulus intak dapat menurunkan penetrasi spermatozoa pada saat fertilisasi *in vitro* (Wongsrikeao *et al.*, 2005), sedangkan pada manusia oosit matur dengan sel-sel kumulus intak sangat berpotensi untuk terfertilisasi saat inseminasi namun rendah fertilitasnya.

Kualitas oosit yang tidak bagus seperti kurangnya sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit akan menyebabkan penurunan metabolisme antara

ooisit dan sel-sel kumulus yang mengakibatkan tidak tersedianya nutrisi yang sangat dibutuhkan selama proses maturasi (Widayati, 1998). Selain itu oosit yang memiliki sel-sel kumulus intak atau COCs akan memungkinkan terjadinya komunikasi intraseluler melalui *gap junction* yang merupakan tempat transfer sebagian oosit denud, meningkatkan *in vitro* maturasi dan menyelamatkan oosit dari degradasi (Adiva, 2010).

Oosit sel-sel kumulus sebagian (*grade 2*) akan menyebabkan maturasi yang kurang sempurna. Hal ini berkaitan dengan maturasi sitoplasma atau transformasi inti yang ditandai dengan diferensiasi dan pembentukan polar bodi I serta maturasi membran (*germinal vesicle*) yang ditandai oleh pemekaran sel-sel kumulus dan terputusnya membran (*germinal vesicle break down*). Berikut adalah gambar yang menyajikan oosit *grade 2* yang digunakan dalam penelitian.

Hasil analisis deskriptif maturasi oosit *in vitro* menggunakan oosit *grade 2* memperlihatkan bahwa antara kelompok perlakuan mempunyai kualitas yang baik (seperti yang terlihat pada Gambar 2) dibandingkan dengan oosit yang dimaturnasikan dalam kelompok kontrol. Gambar 2



Gambar 2. Oosit *grade 2* kelompok perlakuan (+FCS), (a) sebelum maturasi dan (b) setelah maturasi; serta oosit kelompok kontrol (tanpa FCS) (c) sebelum maturasi dan (d) setelah maturasi (*oocyte grade 2 experiment group (+FCS), (a) before maturation and (b) after maturation; oocyte control group (absence FCS) (c) before maturation and (d) after maturation*).

memperlihatkan struktur oosit yang terlihat jelas khususnya pada bagian zona pelusida. Semakin transparannya zona pelusida merupakan indikasi dari maturasi oosit yang sempurna. Hasil penelitian yang sama diperoleh Widayati (1998), yang menemukan tidak efisiennya penambahan sel-sel kumulus pada media maturasi terhadap angka maturasi oosit, namun meningkatkan angka fertilisasi dan pembelahan embrio. Leivas *et al.* (2011) melaporkan bahwa tingginya angka maturasi pada oosit yang diberi perlakuan FCS yang disebabkan oleh kandungan FCS yang merupakan sumber protein dan sangat mendukung aktivitas biologik oosit selama proses maturasi *in vitro*.

Oosit sel-sel kumulus intak (COCs) serta oosit sel-sel kumulus sebagian mempunyai mekanisme yang sama dalam berkomunikasi dengan sel-sel kumulus untuk mematangkan oosit, namun oosit sel-sel kumulus intak mempunyai potensi yang lebih besar dibanding oosit sel-sel kumulus sebagian. Hal ini disebabkan karena sistem calpain-calpastatin yang ditemukan dalam pola ekspresi gen pada COCs dan tidak ditemukan pada *naked oocytes* (oosit sel-sel kumulus sebagian) (Zhu *et al.*, 2007). Sistem calpain-calpastatin merupakan jalur signal selular yang memediasi kalsium,

pengangkutan enzim, aktivasi reseptor serta proses seluler lainnya yang meliputi siklus regulasi sel, diferensiasi sel serta apoptosis (Ben-Aharon *et al.*, 2005). Sistem calpain-calpastatin inilah yang membedakan kualitas maturasi antara oosit sel-sel kumulus intak dan oosit sel-sel kumulus sebagian, baik dalam pemekaran sel-sel kumulus maupun transparannya zona pelusida.

Keadaan oosit sel-sel kumulus sebagian juga sangat mempengaruhi maturasi sitoplasma, hal ini diakibatkan karena selama proses IVM sel-sel kumulus sangat berperan sebagai penghubung dan menyediakan *gap junction* yang merupakan jalur lintas nutrisi bagi oosit (Widayati, 1998). Pada proses IVF, oosit sel-sel kumulus sebagian akan mengalami keterlambatan fertilisasi, hal ini disebabkan karena sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit akan menciptakan suatu lingkungan mikro yang sangat spesifik untuk proses fertilisasi *in vitro* (Yokoo dan Sato, 2004). Oosit sel-sel kumulus intak akan menciptakan lingkungan mikro dalam medium kultur yang lebih baik untuk aktifitas oosit selama proses maturasi dibandingkan oosit sel-sel kumulus sebagian.

Kesimpulan dan Saran

Kesimpulan

Suplementasi *fetal calf serum* (FCS) dalam media maturasi dapat meningkatkan angka maturasi dan dapat memperbaiki kualitas maturasi *in vitro* oosit sapi berdasarkan *grade*-nya.

Saran

Proses maturasi oosit secara *in vitro* dengan menggunakan FCS 10% dan inkubator CO₂ modifikasi dapat menghasilkan oosit dengan maturasi yang sempurna, sehingga diharapkan penelitian lanjutan seperti fertilisasi *in vitro* dan kultur embrio *in vitro* dengan kadar FCS 10% dan menggunakan inkubator CO₂ modifikasi.

Daftar Pustaka

- Abe, H., S. Yamashita, T. Itoh, T. Satoh and H. Hoshi. 2002. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro*-matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum-free medium or in serum-supplemented medium. *Mol. Repr. Dev.* 56: 326-336.
- Adiva, N. S., P. Astuti, dan D.T. Widyawati. 2010. Pengaruh penambahan *chorionic gonadotrophin* pada medium maturasi terhadap kemampuan maturasi, fertilisasi, dan perkembangan embrio secara *in vitro* kambing Peranakan Ettawa. *Buletin Peternakan* 34: 8-15.
- Alm, H., H. Torner, B. Lohrke, T. Viergutz, I. M. Ghoneim and W. Kanitz. 2005. Bovine blastocyst development rate *in vitro* is influence by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63: 194-205.
- Anguita, B., L. Vandaele, B. Mateusen, D. Maes and A. Van Soom. 2007. Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 67: 37-49.
- Ben-Aharon, I., D. Ben-Yosef, B. Amit and R. Shalgi. 2005. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system in the human oocyte. *Fertil. Steril.* 83: 1807-1813.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryo*. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Hammam, A. M., C. S. Whisnant, A. Elias, S. M. Zaabel, A. O. Hegab and E. M. Abu-El Naga. 2010. Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffaloes (*bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.* 9: 27-31.
- Holm, P., P.J. Booth, M.H. Schimidit, T. Greve and H. Callesen. 2002. High Bovine. Blastocysts development in a statistic *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology* 52: 683-700.
- Koo, D. B., N. H. Kim, H. T. Lee and K. S. Chung. 1997. Effects of fetal calf serum, amino acids, vitamins and insulin and blastocoel formation on hatching of *in vivo* and IVM/IVF-derived porcine embrio developing *in vitro*. *Theriogenology* 48: 791-802.
- Ksiazkiewicz, K. L., J. Opiela and B. Rynska. 2007. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology* 68: 736-744.
- Leivas, F. G., D. S. Brum, S. S. Fialho, W. P. Saliba, M. T. T. Alvim, M. L. Bernardi, M. I. B. Rubin and C. A. M. Silva. 2011. Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* 75: 429-433.
- Lonergan, P., D. Rizos, A. G. Adan, T. Fair and M. T. Boland. 2003. Oocyte and embryo quality: affect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 59-67.
- Lorenzo, P. L., M. J. Illera, J. C. Illera and M. Illera. 1994. Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation *in vitro* of bovine oocytes. *Theriogenology* 44: 109-118.
- Moore, K. and A. Q. Bonilla. 2006. Cryopreservation of mammalian embryo. *Biomed. Sci.* 8: 19-32.
- Mtango, N. R., M. D. Varisanga, Y. J. Dong, R. Rajamahendran and T. Suzuki. 2003. Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw servival of vitrified bovine blastocyst. *Theriogenology* 59: 1393-1402.
- Mucci, N. J. A., G. G. Kaiser, F. Hozbor, J. Cabodevila and R. H. Alberio. 2006. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology* 65: 15-26.

- Pujol, M., M. L. Bejar and M. T. Paramio. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61: 35-44.
- Rizos, D., S. Papadopoulou, P. Duffy, M. Wade, K. Quinn, M. P. Boland and P. Lonergan. 2002. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *J. Anim. Sci.* 106: 395-406.
- Rustanto dan Sugiono. 1997. Lahirnya pedet tabung pertama di Indonesia. *Infovet*. Edisi 5, September. Pp. 24-25.
- Rutledge, M. L., H. M. Florman and N. L. First. 1986. The molecular biology of mammalian oocyte maturation. *J. Biol. Fert.* 74: 35-44.
- Sagirkaya, H., M. Misirlioglu, A. Kaya, N. L. First, J. J. Parrish and E. Memili. 2007. Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* 101: 225-240.
- Sagirkaya, H., M. Yaúmur, Z. Nur and M. K. Soylu. 2004. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the *in vitro* maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. *Vet. Anim. Sci.* 28: 779-784.
- Shen, P. C., S. N. Lee, B. T. Liu, F. H. Chub, C. H. Wang, H. H. Lin and W. T. K. Cheng. 2008. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 106: 1-12.
- Tavares, L. M. T., W. B. Feitosa, M. R. B. Mello, A. C. Nicácio, A. S. Lima, M. E. O. A. Assumpcao and J. A. Visintin. 2008. Is the early reduction of fetal calf serum concentration in bovine *in vitro* embryo culture beneficial. *J. Anim. Reprod.* 5: 34-38.
- Wattimena, J., T. R. Tagama, dan B. Hadisusanto. 2006. Pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 8: 94-99.
- Widayati, D. T. 1998. Pengaruh penambahan sel-sel kumulus pada media maturasi terhadap kemampuan maturasi oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio sapi Peranakan Ongol *in vitro*. Tesis Program Sains Veterinary. Pascasarjana Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Wongsrikeao, P., Y. Kaneshige, R. Ooki, M. Taniguchi, B. Nii. M. Agung and T. Otoi. 2005. Effect of the removal of cumulus cells on the nuclear maturation, fertilization and development of porcine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.* 40: 166-170.
- Yokoo, M. and E. Sato. 2004. Cumulus-oocyte complex interactions during oocytes maturation. *Int. Rev. Cytol.* 235: 251-291.
- Zhu, G. Y., S. T. Feng, J. T. Li, Y. L. Mu, D. K. Pan and B. R. Guo. 2007. Comparison of gene expression pattern between porcine cumulus oocytes complexes and naked oocytes. *J. Anim. Sci.* 37: 57-63.