

Pengaruh Serum Domba dan Serum Domba Estrus terhadap Tingkat Maturasi dan Fertilisasi Oosit Domba *In Vitro*

J. WATTIMENA dan M. VEERMAN

Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Pattimura Ambon.
Jl. Ir. M. Putuhena Poka-Ambon 97233, Tel (0911) 315984

(Diterima dewan redaksi 19 Agustus 2004)

ABSTRACT

WATTIMENA, J. and M. VEERMAN. 2005. The Effect of sheep serum and estrus sheep serum on *in vitro* maturation and fertility rate of ewe oocyte. *JITV* 10(1): 12-16.

The main objective of this research was to obtain the effect of sheep serum (SS) and estrus sheep serum (ESS) on *in vitro* maturation oocyte and ovine fertilization. This study was carried out in experimental laboratory in animal reproduction laboratory, Faculty of Animal Husbandry, Padjadjaran University. Results showed that treatments significantly ($P < 0,05$) influenced on maturation rate for germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase-I (M-I) and metaphase-II (M-II), but no significantly ($P > 0,05$) results observed on ovine *in vitro* fertilization (1, 2 and > 2 pronuclei). Concentration of 10-20% ESS in CR1aa media were significantly ($P < 0,05$) better than that of SS on maturation rate of ovine oocyte.

Key Words: Sheep Serum, Estrus Sheep Serum, Maturation, Fertilization

ABSTRAK

WATTIMENA, J. dan M. VEERMAN. 2005. Pengaruh serum domba dan serum domba estrus terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit domba *in vitro*. *JITV* 10(1): 12-16.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh serum domba (SS) dan serum domba estrus (ESS) terhadap tingkat maturasi dan fertilisasi oosit domba. Penelitian dilakukan di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran Bandung. Metode yang digunakan adalah eksperimen laboratorium. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap tingkat maturasi {tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), tahap *metafase-I* (M-I) dan *metafase-II* (M-II)}. ESS dengan konsentrasi 10-20% dalam media maturasi CR1aa nyata ($P < 0,05$) meningkatkan tingkat maturasi *in vitro* oosit domba dibandingkan dengan SS, dengan demikian dapat digunakan sebagai serum alternatif menggantikan serum industri farmasi SS. Perlakuan berpengaruh tidak nyata ($P > 0,05$) terhadap tingkat fertilisasi oosit domba (1, 2 dan > 2 pronukleus).

Kata Kunci: Serum Domba, Serum Domba Estrus, Maturasi, Fertilisasi

PENDAHULUAN

Perkembangan ilmu dan teknologi pada beberapa dekade terakhir telah melahirkan bioteknologi reproduksi seperti *in vitro fertilization* (IVF) atau fertilisasi *in vitro* (FIV). Aplikasi teknologi FIV di masa datang diharapkan akan meningkatkan kinerja reproduksi dan mutu genetik ternak, namun demikian aplikasi teknologi FIV dalam kenyataannya sangat lamban. Hal ini disebabkan karena terdapat sejumlah kendala dan pembatas. Menurut KANAGAWA *et al.* (1989), dua pembatas utama dalam aplikasi teknologi FIV adalah maturasi oosit *in vitro* dan kapasitas spermatozoa *in vitro*, sedang kendala yang dihadapi diantaranya adalah media kultur.

Serum dapat dipakai sebagai bahan suplementasi dalam media kultur, karena serum memiliki komponen esensial seperti: protein, hormon, faktor-faktor

pertumbuhan, mineral, lipid yang diperlukan untuk maturasi, fertilisasi maupun perkembangan embrio (ECKERT dan NIEMANN, 1994; BAVISTER, 1995). Serum yang digunakan sebagai bahan suplementasi pada media kultur bersumber dari serum pro-estrus (YOUNIS *et al.*, 1989), serum estrus (SCHELLANDER *et al.*, 1990), *superovulated cow serum* hari ke-0 dan ke-7 (MATSUOKA *et al.*, 1992; BOEDIONO *et al.*, 2000), serum domba hari ke-0 dan ke-6 (RUSIYANTONO *et al.*, 2000) dan berbagai kombinasinya mampu menstimulir maturasi oosit, fertilisasi dan perkembangan embrio sapi, domba dan kambing. Serum dalam media maturasi, kapasitas, fertilisasi dan perkembangan embrio sangat dibutuhkan tetapi konsentrasi serum yang dapat disuplementasi dalam media kultur bervariasi antara 5-10% (TROUNSON dan GARDNER, 1993; BUTLER, 1996).

Pengaruh positif dari adanya serum pada proses maturasi oosit *in vitro* diduga bereaksi melalui sel-sel kumulus atau secara langsung pada oosit. Serum juga mengandung faktor pertumbuhan yang memiliki peranan dalam pengaturan maturasi oosit, khususnya melalui sel-sel kumulus (SKINER dalam TROUNSON, 1992).

Suplementasi serum domba estrus (ESS) hari ke-0 konsentrasi 10% dan serum pasca estrus (hari ke-6) konsentrasi 10% dalam media TCM199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II (68,7 dan 67,6%), lebih baik dibandingkan dengan *fetal lamb serum* (FLS) konsentrasi 10% (32,9%) (RUSIYANTONO *et al.*, 2000). *Super-ovulated cow serum* (SCS) konsentrasi 10% dan *fetal calf serum* (FCS) konsentrasi 10% dalam media TCM199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II (28,0 dan 22,2%) (DJUWITA *et al.*, 1995). ESS konsentrasi 20% dan *ovine follicular fluid* (OFF) konsentrasi 20% dalam media TCM199 menghasilkan tingkat maturasi oosit domba tahap metafase-II masing-masing ESS (86,0%) dan OFF (76,0%) (RAO *et al.*, 2002).

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

MATERI DAN METODE

Media koleksi ovarium, oosit dan maturasi *in vitro*

Media koleksi ovarium adalah NaCl fisiologis ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml. Media koleksi oosit adalah *modified phosphate buffered saline* (mPBS). Media maturasi adalah *Charles Rosenkrans-1aa* (CR1aa) ditambah penisilin 100 IU/ml, streptomisin 100 µg/ml dan *follicle stimulating hormone*/FSH (Sigma, USA) 0,01 mg/ml. Media maturasi disuplementasi dengan SS, Sigma, USA dan ESS dengan konsentrasi 10, 15 dan 20% sebagai perlakuan.

Koleksi ovarium, oosit dan maturasi *in vitro*

Ovarium yang digunakan dalam penelitian bersumber dari ovarium domba lokal, dikoleksi dari rumah potong hewan (RPH) dan disimpan dalam

termos dengan media koleksi (NaCl fisiologis) suhu 30-35°C. Ovarium dibilas dengan media koleksi, oosit dikoleksi dengan metode *slicing* dan dicuci 3 kali, pencucian terakhir dengan media maturasi (CR1aa). Hanya oosit kualitas A dan B yang digunakan sebagai penelitian. Tiga cuplikan media maturasi oosit (CR1aa) dibuat pada petridish (100 µL/drops) lalu ditutup dengan *mineral oil* (Sigma, USA). Oosit dipindahkan ke dalam *drops* 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* (PAWSHE *et al.*, 1994; BYRD *et al.*, 1997). Setelah penggundulan sel-sel kumulus, oosit difiksasi dalam larutan asam asetat dan etanol (1:3) pada suhu kamar selama 24 jam. Oosit diwarnai dengan 1% *orcein* dalam 45% asam asetat dan dievaluasi dengan mikroskop fase kontras.

Kapasitasi spermatozoa dan fertilisasi *in vitro*

Spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* adalah spermatozoa ejakulat segar, dikoleksi dari pejantan (2,7 tahun) menggunakan vagina buatan. Pencucian (*washing*) semen dilakukan dengan sentrifugasi 500 G selama 5 menit dalam larutan *Brackett and Oliphant* (BO) sebanyak 3 kali. Media kapasitasi dan fertilisasi *in vitro* adalah BO yang disuplementasi dengan ESS konsentrasi 20%. Spermatozoa hasil pencucian diencerkan hingga konsentrasi menjadi 5x10⁶ spermatozoa/ml. Oosit yang telah matang dicuci 3 kali dengan media fertilisasi, kemudian dilakukan fertilisasi dalam media drop/tetes sebanyak 100 µl berisi 10-15 oosit. Fertilisasi dilakukan selama 5 jam dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 38,5°C, kelembaban 95%. Oosit hasil fertilisasi dipindahkan lagi pada media CR1aa sesuai perlakuan kemudian diinkubasi selama 16-18 jam. Setelah 16-18 jam diinkubasi dilakukan evaluasi hasil fertilisasi *in vitro*.

Evaluasi hasil fertilisasi *in vitro* dilakukan melalui pewarnaan *aceto-orcein*. Setelah 16-18 jam difertilisasi, oosit diambil dari media fertilisasi dan dibebaskan dari spermatozoa yang menempel (menggunakan pipet dengan diameter sesuai ukuran oosit). Oosit difiksasi dengan larutan asam asetat dan etanol (1:3) pada suhu kamar selama 24 jam, kemudian diwarnai dengan *aceto-orcein* dan dievaluasi menggunakan mikroskop fase kontras. Oosit dengan 2 pronukleus menunjukkan bahwa oosit mengalami fertilisasi secara normal (BYRD *et al.*, 1997).

Analisis data

Penelitian menggunakan metode eksperimental laboratorium berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan. Perlakuan yang dicobakan adalah: SS10%, SS15%, SS20%, ESS10%, ESS15%

dan ESS20% (10, 15 dan 20% adalah konsentrasi serum). Parameter yang diamati adalah: tingkat maturasi terdiri dari tahap *germinal vesicle*/GV, *germinal vesicle breakdown*/GVBD, *metafase-I* /M-I dan *metafase-II*/M-II dan tingkat fertilisasi terdiri dari 1 pronukleus adalah oosit gagal mengalami fertilisasi, 2 dan >2 pronukleus adalah oosit yang mengalami fertilisasi. Data dianalisis berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL), dan diuji dengan uji wilayah berganda Duncan's (GASPERSZ, 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat maturasi

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan berpengaruh nyata ($P<0,05$) terhadap tingkat maturasi, dan hasil uji jarak berganda menunjukkan bahwa ESS konsentrasi 10-20% nyata ($P<0,05$) meningkatkan tingkat maturasi tahap M-II dibandingkan SS dengan berbagai konsentrasinya. Hal ini diduga karena adanya perbedaan komposisi dan konsentrasi komponen penyusun jenis serum seperti hormon dan faktor pertumbuhan lainnya. Menurut FALLON *et al.* (1988), efektivitas serum dalam IVM dan IVF sangat bervariasi. Hal ini disebabkan bervariasinya konsentrasi substansi serum seperti: hormon, faktor pertumbuhan, asam amino, sitokinesis, vitamin dan faktor lainnya. SANBUISSHO dan THRELFALL (1989), YOUNIS *et al.* (1989), mengatakan bahwa serum yang dikoleksi pada waktu estrus, memberikan respon sangat baik terhadap tingkat maturasi. Hal tersebut karena serum mengandung hormon dan faktor-faktor lain yang potensial untuk perkembangannya.

Tingkat maturasi tahap M-II pada perlakuan ESS konsentrasi 20% (79,98%) (Tabel 1) lebih baik dibandingkan dengan hasil penelitian RUSIYANTONO *et al.* (2000) sebesar 68,7% pada media yang disuplementasi ESS, serta DJUWITA *et al.* (1995) sebesar 28,0% untuk media yang disuplementasi SCS dan 22,2% untuk media yang disuplementasi FCS. Hasil penelitian ini dan RUSIYANTONO *et al.* (2000) lebih baik dibandingkan dengan DJUWITA *et al.* (1995), diduga karena adanya perbedaan penggunaan jenis serum serta media maturasi yang digunakan.

Peningkatan konsentrasi serum pada kedua jenis serum yang dicobakan akan meningkatkan rata-rata maturasi tahap M-II (Tabel 1). Hal ini berarti semakin meningkat konsentrasi serum diduga akan meningkatkan konsentrasi berbagai komponen pemicu terjadinya proses maturasi yang terkandung di dalam serum seperti hormon, protein, energi dan berbagai faktor lainnya sehingga memberikan hasil optimal pada proses maturasi. Hasil penelitian ini diperkuat oleh penelitian sebelumnya. DJATI *et al.* (1999), mengatakan bahwa tingkat maturasi oosit kambing tahap M-II dalam TCM199+20% EGS (*estrus goat serum*) (68,0%) lebih baik dibandingkan dengan TCM199+10% EGS (50,0%). RAO *et al.* (2002), mengatakan bahwa suplementasi ESS20% dalam media maturasi TCM199 menghasilkan tingkat maturasi tahap M-II oosit domba sebesar 86,0%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi serum 20% dalam media maturasi memberikan pengaruh yang positif terhadap peningkatan angka maturasi. Hal ini diperkuat oleh pernyataan LONERGAN (1992) dan MONAGHAN yang disitasi GORDON (1994) bahwa konsentrasi serum terbaik untuk maturasi oosit *in vitro* bervariasi antara 10-20%.

Tabel 1. Pengaruh perlakuan terhadap rata-rata tingkat maturasi tahap GV, GVBD, M-I dan M-II (%)

Perlakuan	Jumlah oosit	Persentase tingkat maturasi (Jumlah oosit)			
		GV	GVBD	M-I	M-II
SS10%	70	8,42 (6) ^a	13,12 (9) ^a	27,66 (20) ^a	50,80 (35) ^a
SS15%	76	6,73 (5) ^a	9,02 (7) ^a	30,21 (23) ^a	54,04 (41) ^a
SS20%	73	5,36 (4) ^a	8,22 (6) ^a	28,65 (21) ^a	57,78 (42) ^a
ESS10%	77	2,50 (2) ^a	3,78 (3) ^b	21,86 (17) ^a	71,86 (55) ^b
ESS15%	75	2,71 (2) ^a	4,89 (4) ^b	17,42 (13) ^b	74,98 (56) ^b
ESS20%	76	0,00 (0) ^b	2,30 (2) ^b	17,71 (13) ^b	79,98 (61) ^b

SS = serum domba, ESS = serum domba estrus; 10, 15 dan 20% adalah konsentrasi serum
Huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P<0,05$)

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap rata-rata tingkat fertilisasi (1, 2 dan >2 pronukleus) (%)

Perlakuan	Jumlah oosit	Persentase tingkat fertilisasi (jumlah oosit)		
		1 Pn	2 Pn	>2Pn
SS10%	32	37,50 (12)	50,00 (16)	12,50 (4)
SS15%	28	21,67 (6)	56,67 (16)	16,66 (4)
SS20%	42	25,67 (10)	62,33 (26)	4,00 (2)
ESS10%	32	22,22 (8)	63,89 (20)	8,33 (2)
ESS15%	32	31,67 (10)	68,33 (22)	0,00 (0)
ESS20%	36	31,67 (10)	60,33 (22)	8,00 (4)

SS = serum domba, ESS = serum domba estrus; 10, 15 dan 20% adalah konsentrasi serum

Tingkat fertilisasi

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa jenis dan konsentrasi serum berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap oosit yang tidak mengalami fertilisasi (1 pronukleus) dan tingkat fertilisasi (2 dan >2 pronukleus). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa jenis dan konsentrasi serum tidak berpengaruh terhadap tingkat fertilisasi (2 dan >2 pronukleus). Meskipun perlakuan berpengaruh tidak nyata terhadap tingkat fertilisasi (Tabel 2), nampak bahwa tingkat fertilisasi pada ESS konsentrasi 15% (68,33%) lebih baik dari hasil penelitian RUSYANTONO *et al.* (2000) yang mencapai 65,4% untuk media TCM199 yang disuplementasi dengan ESS. Sementara itu, DJUWITA *et al.* (1995) mendapatkan nilai sebesar 31,7% untuk media TCM199 yang disuplementasi *ewe fetal serum* (EFS) dan 25,6% untuk media TCM199 yang disuplementasi FCS.

Kegagalan fertilisasi ditandai oleh adanya satu pronukleus pada oosit yang difertilisasi, dan pada penelitian ini bervariasi antara 21,67-37,50% (Tabel 2). Menurut BOEDIONO *et al.* (2000), terbentuknya satu pronukleus diduga berasal dari pronukleus betina yang berkembang tanpa diikuti oleh pembentukan pronukleus jantan. Kegagalan fertilisasi dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain: 1) tingkat maturasi oosit baik inti maupun sitoplasma yang tidak sempurna (MOORE dan TROUNSON dalam BOEDIONO *et al.*, 2000); 2) kemampuan spermatozoa membuahi oosit kurang optimal akibat kapasitas dan reaksi akrosom yang kurang memadai dan 3) kegagalan spermatozoa mengalami kondensasi dalam sitoplasma oosit sehingga menyebabkan kegagalan pembentukan pronukleus jantan (CROZET *et al.*, 1995).

Kejadian polispermi pada penelitian ini bervariasi antara 0,00-16,66% (Tabel 2). Kejadian polispermi disebabkan berbagai faktor seperti: konsentrasi spermatozoa, lama waktu inkubasi spermatozoa dan oosit serta tidak sempurnanya blokade vitelin. LONG *et al.* (1994) mengatakan bahwa konsentrasi spermatozoa yang

tinggi akan meningkatkan kejadian polispermi tetapi tidak berpengaruh terhadap tingkat penetrasi monospermi. Menurut NADIR *et al.* (1993) bahwa konsentrasi spermatozoa yang rendah akan mengurangi kejadian polispermi tetapi tidak meningkatkan tingkat fertilisasi monospermi dan tahap perkembangan embrio. SAEKI *et al.* disitasi LONG *et al.* (1994) melaporkan bahwa pengurangan waktu inkubasi spermatozoa dan oosit sapi akan mengurangi kejadian polispermi dan lama waktu inkubasi antara 4-6 jam cukup untuk proses fertilisasi. DANDEKAR dan TALBOT (1992), mengatakan bahwa selain konsentrasi spermatozoa yang tinggi faktor lain yang dapat menyebabkan kejadian polispermi adalah tidak efektifnya blokade zona.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa serum domba estrus (ESS) dengan konsentrasi 20% dalam media maturasi CR1aa nyata ($P<0,05$) meningkatkan tingkat maturasi oosit domba secara *in vitro* dibandingkan dengan serum domba (SS). Dengan demikian ESS dapat digunakan sebagai serum alternatif menggantikan serum industri farmasi SS.

ESS dan SS dengan berbagai konsentrasinya berpengaruh tidak nyata ($P>0,05$) terhadap tingkat fertilisasi oosit domba.

DAFTAR PUSTAKA

- BAVISTER, B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *In: Human Reproduction Update*. Oxford University Press. New York. pp. 91-148.
- BOEDIONO, A., Y. RUSYANTONO, M. KUSDIANTORO, I. DJUWITA dan HERLIATIN. 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner* 7(4): 11-17.
- BUTLER, M. 1996. The Basic Animal Culture and Technology. IRL Press. New York.

- BYRD, S.R., G.F. FOXWORTH, A.A. APPLEWHITE and M.E. WESTHUSIN. 1997. *In vitro* maturation of ovine oocytes in a portable incubator. *Theriogenology* 47: 857-864.
- CROZET, N., M.A. ALI and M.P. DUDOS. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 103: 293-298.
- DANDEKAR, P. and P. TALBOT. 1992. Perivitelline space of mammalian oocytes extracellular matrix of unfertilized oocytes and formation of a cortical granule envelope following fertilization. *Mol. Reprod. Develop.* 31: 135-143.
- DJATI, S., FATCHIYAH, G. CIPTADI, N. IANAINI, S. WAHYUNINGSIH, S. RAHAYU dan L. ANGGRAINI. 1999. Tingkat transformasi inti oosit kambing pada medium TCM199 dengan berbagai konsentrasi estrus goat serum. Abstrak Seminar Penelitian Aktual Bioteknologi Reproduksi di Indonesia. Forum Komunikasi Reproduksi, Malang, 19-20 Mei 1999.
- DJUWITA, I., B. PURWANTARA, M. FAHRUDIN and Y. SUKRA. 1995. The effect of superovulated cow serum on *in vitro* maturation and fertilization in sheep. Pros. Symposium on Biotechnology of Animal Reproduction, Bogor. hlm. 20-22.
- ECKERT, J and H. NIEMANN. 1994. *In vitro* maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. *Theriogenology* 43: 1211-1225.
- FALLON, M.N., C.G. RAMMEL and J.J.L. HOOGENBOOM. 1988. Amino acids in bovine sera. *N.Z. Vet. J.* 36: 96-98.
- GASPERSZ, V. 1994. Metode Perancangan Percobaan. Armico. Bandung.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryos, CAB International. Ireland.
- KANAGAWA, H., O.A. MAZNI and C.A. VALDEZ. 1989. Oocyte maturation and *in vitro* fertilization in farm animals. In: Biotechnology for Livestock Production. FAO. pp. 79-95.
- LONG, C.R., P. DAMIANI, C.P. CORREIA, R.A. MACLEAN, R.T. DUBY and J.M. ROBL. 1994. Morphology and subsequent development in culture of bovine oocytes matured *in vitro* under various conditions of fertilization. *J. Reprod. Fertil.* 102: 361-369.
- MATSUOKA, K., S. SAKATA, K. ICHINO, Y. SHIMAYA and T. SUZUKI. 1992. Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to blastocyst stage. *Theriogenology* 37: 254.
- NADIR, S., R.G. SAACKE, J. BAME, J. MULLINS and S. DEGELOS. 1993. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 71: 199-204.
- PAWSHE, C.H., S.M. TOTEY and S.K. JAIN. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 42:117-125.
- RAO, B.S., K.S. NAIDU, D. AMARNOTH, R. VAGDEVI, A.S. RAO, K.V. BRAHMAIAH and V.H. RAO. 2002. *In vitro* maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. *Small Rumin. Res.* 43: 31-36.
- RUSIYANTONO, Y., I. DJUWITA, B. PURWANTARA and Y. SUKRA. 2000. The influence of ewe serum on *in vitro* oocyte maturation and early development of ovine embryos. *Media Vet.* 7(1): 13-16.
- SANBUISSHO, A. and W.R. THRELFALL. 1989. The effects of estrous cow serum on the *in vitro* maturation and fertilization of the bovine follicular oocyte. *Theriogenology* 31: 693-699.
- SHELLANDER, K., F. FUHRER, B.G. BRACKETT, B. KORB and W. SCHLEGER. 1990. *In vitro* fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in medium supplemented with estrous cow serum. *Theriogenology* 33: 477-485.
- TOTEY, S.M., C.H. PAWSHE and G.P. SINGH. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*), effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 39: 1153-1171.
- TROUNSON, A. and D.K. GARDNER. 1993. Handbook of *In Vitro* Fertilization, CRC Press, London.
- TROUNSON, A. 1992. The production of ruminant embryos *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.* 28: 125-137.
- YOUNIS, A.I., B.G. BRACKETT and R.A.F. HOSKEN. 1989. Influence of serum and hormone on bovine oocytes maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res.* 23: 189-201.