

Suplementasi cairan folikel dalam media maturasi *in vitro* oosit domba Garut (*Ovis aries*)

Supplementation of follicular fluid into Garut sheep (*Ovis aries*) oocytes in vitro maturation media

EKAYANTI MULYAWATI KAIIN^{1*}, ANGGER TEGAR PRASETYO², MUHAMMAD GUNAWAN¹, ENNY TANTINI SETIATIN², YON SUPRI ONDHO²

¹Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Jl. Raya Bogor km 46, Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat, Indonesia. Tel.: +62-21-8754587, Fax.: +62-21-8754588, *email: ekayantimk@yahoo.com

²Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. Jl. Prof. Soedarto, Kampus Tembalang, Semarang 50275, Jawa Tengah, Indonesia. Tel./fax.: +62-24-7474750

Manuskrip diterima: 13 November 2019. Revisi disetujui: 2 Maret 2020.

Abstrak. Kaiin EM, Prasetyo AT, Gunawan M, Setiatin ET, Ondho YS. 2020. Suplementasi cairan folikel dalam media maturasi *in vitro* oosit domba Garut (*Ovis aries*). *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 6: 557-561. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh suplementasi cairan folikel ovarium domba yang ditambahkan ke dalam medium maturasi oosit terhadap tingkat ekspansi sel-sel kumulus dan kemunculan badan polar I. Cairan folikel dikoleksi dari ovarium domba Garut dan disimpan pada temperatur -20°C sebelum digunakan. Perlakuan penambahan cairan folikel dengan konsentrasi sebesar 0 (kontrol), 10, 20 dan 30% dalam medium maturasi M-199, digunakan untuk kultur maturasi *in vitro* oosit domba, dikultur di dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 38,5°C selama 22-24 jam. Oosit domba yang digunakan memiliki grade A dan B dengan 7 kali ulangan. Data dianalisis dengan uji statistik non parametrik untuk RAL (Rancangan Acak Lengkap) dan uji lanjut Duncan. Hasil pengamatan terhadap tingkat ekspansi sel-sel kumulus menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antar perlakuan. Penambahan cairan folikel ovarium domba Garut pada media maturasi oosit memberikan pengaruh yang nyata terhadap kemunculan badan polar I dengan nilai tertinggi (56%) pada perlakuan penambahan cairan folikel sebesar 30%. Berdasarkan hasil dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa penambahan cairan folikel ke dalam media maturasi berpengaruh terhadap kemunculan badan polar I yang merupakan ciri utama dari matangnya oosit.

Kata kunci: Badan polar I, domba Garut, folikel, maturasi, ovarium

Abstract. Kaiin EM, Prasetyo AT, Gunawan M, Setiatin ET, Ondho YS. 2020. *Supplementation of follicular fluid into Garut sheep (Ovis aries) oocytes in vitro maturation media.* *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon* 6: 557-561. The study was conducted to determine the effect of supplementation of sheep ovarian follicular fluid added to the oocyte maturation media on the rate of expansion of cumulus cells and the appearance of polar bodies I. Follicular fluid collected from the ovaries of Garut sheep and stored at -20°C before use. The treatment of adding follicular fluid with concentrations of 0 (control), 10, 20 and 30% in the M-199 maturation medium was used for *in vitro* maturation of sheep oocyte, then cultured in a 5% CO₂ incubator with temperature 38.5°C for 22-24 hours. Sheep oocytes used were graded A and B with 7 replications. Data were analyzed by non-parametric statistical tests for Complete Random Design (CRD) and Duncan's follow-up test. The observation of the rate of expansion of cumulus cells showed no significant difference between treatments. Addition of Garut sheep ovarian follicular fluid in oocyte maturation media had a significant effect on the appearance of polar I bodies with the highest value (56%) in the treatment of 30% follicular fluid addition. Based on the results, it can be concluded that the addition of follicular fluid into the maturation medium influences the appearance of the polar I body which is the main characteristic of oocyte maturation.

Keywords: Follicle, Garut sheep, maturation, ovary, polar body I

PENDAHULUAN

Domba Garut merupakan domba asli Indonesia yang berasal dari wilayah Priangan hasil persilangan 3 bangsa domba, yaitu domba Merino, domba Kaapstad, dan domba lokal dan domba terbaik hasil persilangan ketiga bangsa tersebut terdapat di daerah Garut (Kartika 2008). Ovarium pada domba berbentuk bulat atau oval, memiliki ukuran seperti bola kelereng dengan diameter sekitar 10-15 mm,

dan berat sekitar 2-3 gr/ovarium. Ovarium pada domba memiliki sekitar 12.000-86.000 folikel (Land dan Robinson 1985). Ovarium memiliki dua fungsi dasar, yaitu memproduksi sel telur (oosit) dan mensekresi hormon seks betina seperti estradiol dan progesteron. Hormon-hormon tersebut berperan dalam mempersiapkan organ reproduksi dan memelihara kebuntingan (Mardhiana 2001). Usia kematangan kelamin pada domba betina bergantung pada umur dan nutrisi, semakin baik nutrisi yang diperoleh, maka

akan semakin cepat mengalami kematangan kelamin. Umumnya usia kematangan kelamin domba betina adalah sekitar 10 bulan (Abebe 2018). Ovarium terdiri atas dua bagian, yaitu bagian medula dan bagian korteks. Bagian medula terdiri atas jaringan ikat fibroelastik yang tidak teratur, sistem saraf, dan pembuluh darah yang masuk ke dalam ovarium melalui hilus, sedangkan bagian korteks terdiri atas folikel dan *corpus luteum* yang dilapisi oleh epitel permukaan berbentuk kubus rendah, serta sebagai tempat pembentukan hormon (Mardhiana 2001). Teknologi reproduksi berbantuan merupakan suatu teknik yang bertujuan untuk menghasilkan embrio yang dapat ditransfer, teknologi tersebut di antaranya adalah *In Vitro Maturation* (IVM) dan *In Vitro Fertilization* (IVF) untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*.

Maturasi oosit merupakan aspek penting untuk mendukung keberhasilan proses fertilisasi *in vitro*. Proses meiosis yang terjadi pada saat maturasi, menyebabkan perubahan oosit primer menjadi oosit sekunder dan badan polar I (BP I) serta jumlah kromosom menjadi haploid (Fibrianto et al. 2000; Wattimena et al. 2006). Oosit yang dimaturasi secara *in vitro* akan mengalami ekspansi sel kumulus dan terjadi perubahan pada ruang perivitelin dengan terbentuknya badan polar I (Gordon 1994), hal tersebut merupakan indikasi terjadinya tahapan meiosis dan keberhasilan tahapan metaphase II (MII) (Lv et al. 2010). Keberhasilan maturasi oosit dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti pemilihan media yang tepat serta adanya penambahan serum atau hormon di dalam media maturasi (Gustari et al. 2009). Cairan folikel merupakan salah satu komponen yang dapat ditambahkan ke dalam media maturasi untuk meningkatkan keberhasilan maturasi *in vitro*. Cairan folikel merupakan cairan yang mengisi folikel antrum yang mengelilingi ovum dalam folikel ovarium yang mengandung protein, asam amino, enzim, karbohidrat, glikoprotein serta beberapa hormon yang mendukung proses maturasi (Hafez dan Hafez 2000). Cairan tersebut juga mengandung asam hialuronat dan hormon estrogen yang berperan dalam proliferasi sel, serta menyediakan lingkungan mikro yang penting bagi perkembangan oosit. Hormon lainnya yang terdapat di dalam cairan folikel adalah hormon progesteron berperan untuk menstimulasi diferensiasi sel dan estradiol untuk pembentukan spindle dan badan polar (Wattimena dan Saija 2005). Gupta et al (2001) menyatakan bahwa penggantian media maturasi *in vitro* dengan cairan folikel spesies yang sama, dapat menstimulasi kondisi yang sama dengan kondisi maturasi *in vivo*. Penambahan cairan folikel pada media maturasi juga meningkatkan jumlah sel/blastomer pada blastosis (Kim et al. 1996). Hasil penelitian Sun et al (1994) menunjukkan adanya peningkatan kemampuan maturasi dan fertilisasi oosit domba dengan penambahan cairan folikel domba atau manusia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan cairan folikel ovarium pada media maturasi oosit domba Garut terhadap tingkat ekspansi sel kumulus dan maturasi oosit pada pembentukan badan polar I.

BAHAN DAN METODE

Area kajian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Kultur Sel Hewan, Puslit Bioteknologi LIPI, Cibinong Jawa Barat. Sampel oosit diperoleh dari ovarium domba Garut (*Ovis aries*) yang diperoleh dari Rumah Potong Hewan Sentul Bogor. Oosit yang memiliki grade A dan B yang digunakan dalam penelitian ini.

Cara kerja

Koleksi cairan folikel

Cairan folikel dikoleksi dari ovarium domba Garut sebelum penelitian, aspirasi cairan folikel dilakukan di dalam laminar air flow (Telstar BH-100) menggunakan syringe 3 ml dengan jarum 18 G (Terumo). Hasil aspirasi dikumpulkan dalam mikrotube 1,5 ml kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm (EBA 20 Hettich). Supernatan dikoleksi dan dimasukkan ke dalam mikrotube steril lainnya. Hasil koleksi kemudian disimpan di dalam freezer -20°C (Ing Climas) sampai saat akan digunakan.

Koleksi ovarium dan oosit

Ovarium domba Garut hasil pembedahan, dikoleksi dan dibersihkan dari jaringan lemak dan lainnya. Setelah itu dimasukkan ke dalam media Ringer laktat dengan penambahan Bovine Serum (BS) 1 % dan antibiotik Penisilin Streptomisin (1ml/L) yang disimpan dalam termos elektrik (*Minitube*) dengan temperatur 37°C di dalam box untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium. Ovarium kemudian dicuci dengan media DPBS yang telah ditambahkan BS 1% dan disimpan di dalam gelas Beaker. Koleksi oosit dilakukan dengan metoda aspirasi dan sayatan. Aspirasi oosit dilakukan menggunakan syringe 3 ml dengan jarum 18G (Terumo). Sebanyak 1 ml media DPBS serum dimasukkan ke dalam syringe, kemudian jarum diarahkan ke folikel dan aspirasi dilakukan secara perlahan untuk mengurangi kerusakan oosit dan sel kumulus. Setelah semua folikel diaspirasi, kemudian dilakukan penyayatan ovarium di dalam cawan petri berisi media DPBS serum untuk memperoleh oosit. Oosit kemudian dievaluasi kualitasnya, hanya oosit grade A dan B digunakan pada penelitian ini.

Maturasi oosit

Oosit hasil koleksi dicuci dengan media M-199 di dalam drop yang ditutupi dengan mineral oil, setelah itu dipindahkan ke dalam drop media maturasi yang telah diekubikasi sebelumnya selama 30 menit. Perlakuan maturasi adalah melakukan penambahan cairan folikel masing-masing sebesar 0; 10; 20 atau 30% ke dalam media M-199. Oosit kemudian dikultur di dalam inkubator CO₂ 5% dengan temperatur 38,5°C selama 22-24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap tingkat ekspansi sel kumulus dengan menggunakan mikroskop *inverted* (Nikon Diaphot, Japan) dan kemunculan BP I dengan mikroskop fluoresens (Imager Z2, Carl Zeiss). Setelah dilakukan pengamatan tingkat ekspansi sel kumulus, oosit dilepaskan dari sel kumulus dengan menambahkan enzim

hyaluronidase dan pemipetan sampai oosit bersih dari sel kumulus, Oosit kemudian dipindahkan ke gelas objek *single concave* dan ditambahkan 10µl pewarna Hoechst 33342 dan 10µl propidium iodide (PI). Setelah itu dilakukan pengamatan di bawah mikroskop fluoresens (Imazer Z2, Carl Zeiss) dengan menggunakan filter DAPI. Parameter pertama yang diamati adalah tingkat ekspansi kumulus dengan evaluasi berdasarkan 3 tingkat yaitu : (1) oosit dengan sel kumulus terekspansi seluruhnya, (2) oosit dengan sel kumulus terekspansi sebagian, (3) oosit dengan sel kumulus tidak terekspansi (Mahdiyah 2006). Parameter kedua adalah kemunculan BP I yang merupakan tanda kematangan oosit yaitu mencapai tahap metafase II (Widayati et al. 2014).

Analisis data

an dan uji Kruskal Wallis, jika terdapat perHasil yang diperoleh diuji menggunakan uji statistik non parametrik untuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan dan 7 ulangan. Parameter yang diamati adalah tingkat ekspansi sel kumulus dan kemunculan BP I. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji non parametrik: uji Friedmbedaan yang nyata, dilanjutkan dengan uji beda nyata Duncan.

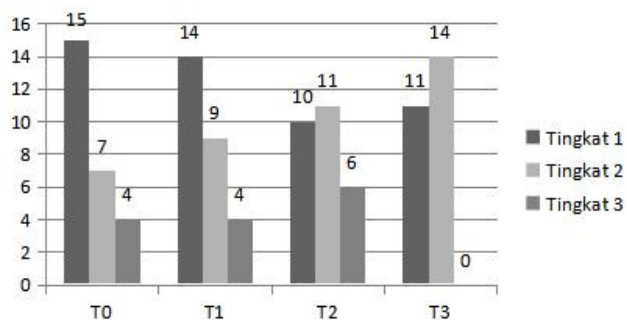
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pengaruh suplementasi cairan folikel ovarium terhadap tingkat ekspansi sel kumulus ditampilkan pada Gambar 1. Tingkat ekspansi oosit hasil maturasi dengan cairan folikel, ditampilkan pada Gambar 2. Hasil pengamatan pengaruh suplementasi cairan folikel ovarium terhadap kemunculan badan polar I ditampilkan pada Gambar 3. Hasil pengamatan oosit dengan badan polar I ditampilkan pada Gambar 4.

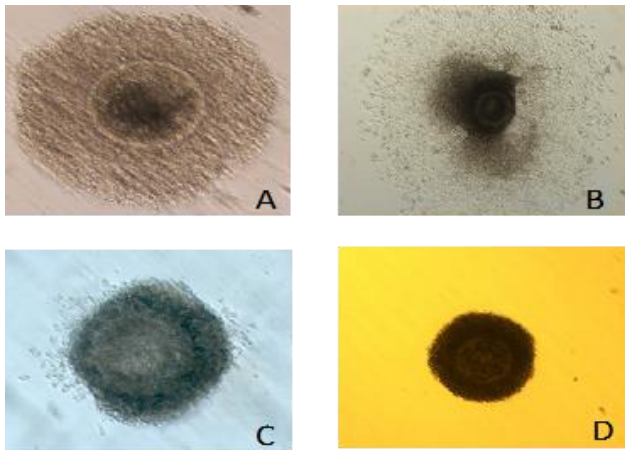
Hasil analisis statistik dengan uji Friedman untuk menguji pengaruh suplementasi cairan folikel ke dalam media maturasi *in vitro* terhadap tingkat ekspansi sel kumulus diperoleh hasil tidak berbeda nyata. Hal tersebut menandakan bahwa penambahan cairan folikel sebanyak 10, 20 dan 30% tidak berpengaruh terhadap tingkat ekspansi sel kumulus. Klasifikasi oosit dengan tingkat ekspansi dapat dilihat pada Gambar 2. Perlakuan suplementasi cairan folikel sebesar 30% (T3) tidak terdapat sel kumulus yang tidak terekspansi tingkat 3. Perlakuan penambahan cairan folikel 0% diperoleh jumlah oosit dengan tingkat ekspansi sempurna terbanyak (Gambar 1).

Tidak ditemukannya sel kumulus yang tidak berekspansi pada penambahan cairan folikel 30%, kemungkinan disebabkan medium mengandung hormon-hormon pendukung proses maturasi *in vitro* yang lebih banyak dari perlakuan 10% dan 20%. Hormon pendukung tersebut di antaranya estrogen, FSH, LH yang terkandung dalam cairan folikel yang ditambahkan. Faktor pertumbuhan sangat penting pada proses maturasi dan hormon yang dihasilkan folikel adalah hormon FSH yang berperan dalam ekspansi sel kumulus. Komposisi biokimia cairan folikel berdiameter 10-22 mm terdiri atas kalsium, fosfor, glukosa, urea, kreatinin, kolesterol, trigliserida,

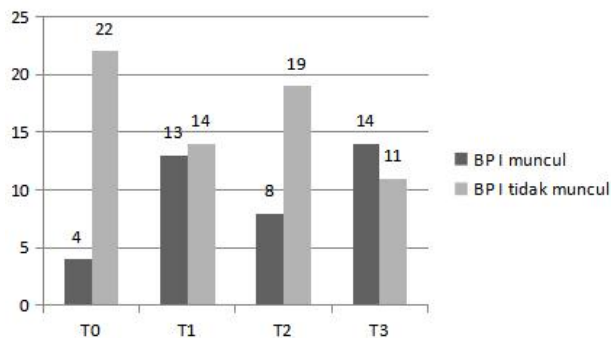
protein, albumin, globulin, alkalin fosfatase (ALK), laktat dehidrogenase (LDH), aspartat aminotransferase (ASAT), dan alanin aminotransferase (ALAT), serta beberapa faktor yang menstimulasi kematangan oosit seperti *Insulin-like Growth Factor* (IGF-I), *IGF Binding Proteins* (IGFBPs), *Folicle Stimulating Hormone* (FSH), *Luteinizing Hormone* (LH) (Gordon 1994, Hafez dan Hafez 2000, Tabatabaei dan Mamoei 2011, Ubaidullah et al. 2009). Selain itu dapat mengandung antikoagulan, elektrolit, ROS dan antioksidan yang berperan dalam fertilisasi *in vivo* (Basuino dan Silveira 2016). ROS dan antioksidan yang terkandung di dalam cairan folikel oosit sapi dapat memperbaiki potensi perkembangan oosit selama maturasi (Revelli et al. 2009). Berdasarkan hasil penelitian Hoque et al. (2012), cairan folikel merupakan cairan yang mengandung beberapa faktor alami yang mempengaruhi proses maturasi oosit. Mahdiyah (2006) dan Wattimena (2006) menyatakan bahwa hormon *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) mendukung proses maturasi secara *in vitro*. FSH yang terkandung di dalam cairan folikel dapat meningkatkan dan menstimulasi pertumbuhan dan pematangan folikel *de Graaf* serta mempengaruhi tingkat ekspansi sel kumulus. Penambahan cairan folikel sapi yang dikoleksi pada 20 jam setelah terjadi lonjakan LH, sebesar 10% dan 40%, menghasilkan ekspansi sel kumulus sebesar 89% dan 98% (Romero dan Seidel 1996). Hikmah (2017) menambahkan cairan folikel sebanyak 20% pada medium maturasi oosit sapi dapat meningkatkan ekspansi sel kumulus. Hasil yang berbeda diperoleh pada penambahan cairan folikel kambing pada maturasi oosit kambing Bengal, menghasilkan tingkat ekspansi kumulus tingkat 3 yang berbeda nyata setelah ditambahkan cairan folikel sebanyak 5% dan 10%. Hal serupa terjadi juga pada proses maturasi inti oosit (Hoque et al. 2012). Pada penelitian ini, penambahan cairan folikel domba Garut tidak mempengaruhi tingkat ekspansi sel kumulus, kemungkinan disebabkan adanya perbedaan konsentrasi kandungan hormon dan *growth factor* yang terdapat pada cairan folikel sampel yang digunakan pada penelitian ini dibandingkan dengan hewan lainnya seperti sapi dan kambing Bengal pada penelitian lain. Hal tersebut perlu dibuktikan dengan penelitian lebih lanjut mengenai gambaran profil hormon dan *growth factor* pada cairan folikel ovarii.



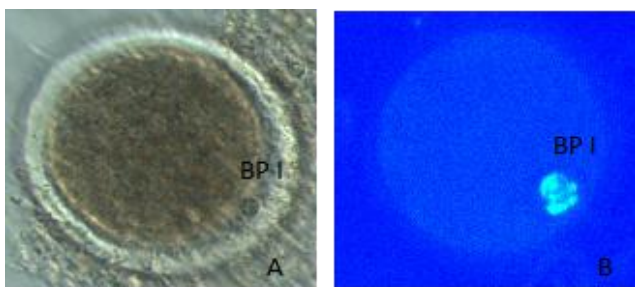
Gambar 1. Tingkat ekspansi sel kumulus oosit hasil maturasi dengan cairan folikel 0% (T0), 10% (T1), 20% (T2), 30% (T3)



Gambar 2. Sel kumulus terekspansi (100x). A. Pra-maturasi, B. Tingkat 1, C. Tingkat 2, D. Tingkat 3



Gambar 3. Kemunculan badan polar I pada oosit hasil maturasi dengan cairan folikel



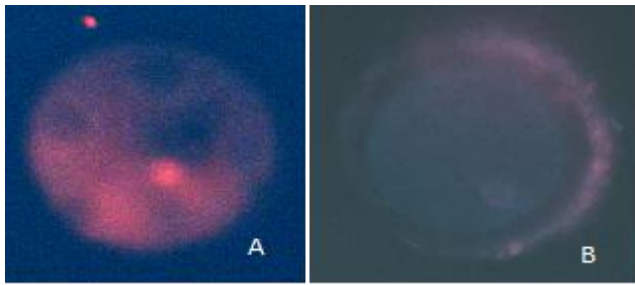
Gambar 4. Oosit hasil maturasi dengan BP I (200x). A. Pengamatan native B. Pengamatan fluoresens dengan pewarnaan Hoecsht-PI

Sel kumulus mempunyai peranan penting dalam proses maturasi oosit yaitu sebagai penyalur bahan nutrisi oosit dari medium dan sebagai pensintesis protein dan asetat menjadi kolesterol. Kolesterol dibutuhkan sebagai prekursor hormon steroid yang berfungsi menstimulasi proses maturasi oosit. Pada kondisi sel kumulus tidak terekspansi, maka diartikan terjadi malnutrisi dan mengakibatkan kegagalan maturasi. Ekspansi sel kumulus

terjadi bertepatan dengan terjadinya meiosis. Sel kumulus distimulasi oleh FSH dan *growth factor* untuk memproduksi dan mengeksresikan asam hialuronik yang menyebabkan ekspansi sel kumulus (Mahdiyah 2006). Asam hialuronik merupakan komponen utama pada matriks ekstraseluler, konsentrasi tertentu pada cairan folikel dapat digunakan sebagai indikator viabilitas oosit setelah fertilisasi (Saito et al. 2000), karena asam hialuronik berperan penting selama kultur oosit dan perkembangan embrio sampai proses transfer embrio (Mohammed et al. 2019). Ekspansi sel kumulus merupakan salah satu patokan dalam penentuan kualitas oosit hasil maturasi *in vitro* (MIV). Hasil penelitian Widayati et al. 2014 yang menambahkan cairan folikel sebesar 20% ke dalam media 199, menghasilkan kuantitas dan kualitas maturasi oosit dengan kumbang blingon dibandingkan dengan penambahan dengan serum FCS 20% ataupun tanpa suplementasi. Sedangkan penambahan cairan folikel sebesar 75% dan 100% meningkatkan maturasi inti oosit sapi (Cruz et al. 2014). Demikian juga penggunaan cairan folikel sebesar 100% menghasilkan maturasi inti oosit mencit yang tertinggi mencapai tahap MII (Abbazadeh et al. 2014)

Hasil analisis statistik dengan uji Kruskal Wallis terhadap pengaruh suplementasi cairan folikel ke dalam media maturasi menunjukkan hasil yang berbeda nyata dibandingkan dengan kelompok kontrol tanpa penambahan cairan folikel. Hasil tertinggi memunculkan BP I tampak pada penambahan cairan folikel sebanyak 30% (Gambar 3). Oosit dengan BP I dapat dilihat pada Gambar 4. Revelli et al. (2009) menyatakan bahwa cairan folikel menyediakan lingkungan mikro yang sangat penting untuk perkembangan oosit. Cruz et al. (2014) menyatakan bahwa cairan folikel merupakan cairan elektrolit yang terdiri atas hormon, *growth factor*, asam amino dan komponen alami lainnya yang berperan dalam proses maturasi secara *in vivo*. Munculnya BP I pada ruang perivitelin merupakan tanda bahwa oosit telah mencapai tahap MII menandakan kematangan oosit dan kromosom inti siap berubah dari diploid menjadi haploid. Proses pembelahan inti oosit melalui proses *prophase*, *metaphase*, *anaphase* dan *telophase* yang berlangsung kurang dari 24 jam. Pada maturasi oosit terjadi perubahan inti dari fase diploten ke M II. Membran inti akan menyatu dengan vesikel membantu *Germinal Vesicle* (GV), setelah itu GV akan mengalami pelepasan membran inti sehingga terbentuk *Germinal Vesicle Brake Down* (GVBD). Kemudian kromosom dibungkus oleh mikrofilamen dan mikrotubulus dan melanjutkan proses *metaphase I*, *anaphase I*, *telophase I* yang berlangsung singkat. Setelah itu oosit mengalami tahap M II yang ditandai dengan adanya badan polar I (Hafez dan Hafez 2000).

Oosit yang tidak menunjukkan BPI diduga disebabkan oleh beberapa faktor seperti kurangnya kemampuan oosit melakukan pembelahan meiosis, kurangnya waktu maturasi *in vitro*, abnormalitas oosit dan status oosit pada saat dikoleksi. Abnormalitas oosit dapat disebabkan oleh proses koleksi dan pencucian yang mengakibatkan kerusakan oosit, sehingga tidak dapat tumbuh dan berkembang secara normal mencapai tahap oosit matang (Mahdiyah 2006).



Gambar 5. A dan B. Oosit rusak/mati setelah maturasi *in vitro* (100 X)

Pada Gambar 5 dengan pewarnaan fluoresens Hoecsht-Propidium Ioda (PI) tampak bahwa oosit rusak atau mati akan berpendar warna kemerahan, sedangkan oosit hidup berwarna biru. Warna merah pada oosit disebabkan masuknya pewarna PI ke dalam sitoplasma sebagai akibat rusaknya membran oosit. Kerusakan oosit kemungkinan disebabkan kondisi yang tidak seragam pada saat koleksi atau adanya abnormalitas oosit sehingga oosit tidak dapat berkembang setelah dimaturasi secara *in vitro*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan cairan folikel ovarium ke dalam media maturasi oosit domba secara *in vitro*, tidak berpengaruh terhadap tingkat ekspansi sel kumulus, namun berpengaruh secara nyata terhadap kemunculan badan polar I yang menandakan oosit mengalami kematangan dan berada pada tahap metaphase II. Penambahan cairan folikel sebanyak 30% pada medium maturasi menghasilkan kemunculan badan polar yang paling tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Inayatur Rahmaniah, Nur Wakhid Sudharmono dan Chandra Prabawa yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbazadeh HA, Faharani RM, Noorozi M, Khoramgah MS, Moayeri A, Nia AAK, Karimfar MH. 2014. Follicular fluid the best medium of maturation, fertilization and development of immature oocytes. *J Bas Res Med Sci* 1 (4): 7-13.
- Abebe G. 2018. Chapter 5: Reproduction in Sheep and Goat. http://www.esgpi.org/Handbook_PDF/Chapter%205_%20Reproducti on%20in%20sheep%20and%20goats.pdf.
- Basuino L, Sileira CF. 2016. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assisted Reproduction* 20 (1): 38-40.
- Cruz MHC, Saralva NZ, da Cruz JF, Oliveira CS, Collado MD, Fernandes H, de Castro FC, Garcia JM. 2014. Effect follicular fluid supplementation during *in vitro* maturation on total cell number in bovine blastocysts produced *in vitro*. *R Bras Zootec* 43 (3): 120-126.
- Fibrianto YH, Kusindarta DL, Soebagyo, S. 2000. Penggunaan serum inaktivasi dari Rumah Potong Hewan pada media fertilisasi *in vitro*. *Mediagama* 2: 1-6.
- Gordon I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. UK University Press, Cambridge.
- Gupta PSP, Namdi S, Ravindranatha BM, Sarma PV. 2001. Effect of buffalo follicular fluid alone and in combination with PMSG and M199 on *in vitro* buffalo oocyte maturation. *Asian-Australian J Anim Sci* 14 (5): 693-696.
- Gustari S, Kardja NWK, Amelia YR, Kurniawan I, Sulisty B. 2009. Tingkat maturasi *in vitro* oosit kambing dalam medium suplementasi serum dan albumin. *Jurnal Veteriner* 10 (4): 194-197.
- Hafez, ESE, Hafez B. 2000. Folliculogenesis, egg maturation, and ovulation. In: Hafez B, Hafez ESE (eds). *Reproduction in Farm Animal*. 7th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Hikmah N. 2017. Pengaruh Penambahan Cairan Folikel Ovari Sapi terhadap Kualitas Maturasi *In Vitro* Oosit Kambing. [skripsi]. Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang.
- Hoque SAM, Khandoker MAMY, Kabiraj SK, Asad LY, Fakruzzaman M, Tareq KMA. 2012. Effect of goat follicular fluid on *in vitro* production of embryo in black Bengal goats. *Iranian J of App Anim Sci* 2 (3): 287-294.
- Kartika L. 2008. Keragaman dan Karakteristik Warna Bulu Domba-Domba Lokal (Ekor Gemuk, Ekor Tipis, Kasar dan Garut). [skripsi] Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Kim KS, Mitsumino N, Fujita K, Utsumi. 1996. The effect of follicular fluid on *in vitro* maturation, oocyte fertilization and the development of bovine embryos. *Theriogenology* 45 (4): 787-799.
- Land RB, Robinson DW. 1985. *Genetics Reproduction in Sheep*. Garden City Press. Ltd, England.
- Lv L, Wenbin Y, Wenzhong L, Youshe R, Fuzhong Li, Kyung-Bon L, Goerge WS. 2010. Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocyte collected from prepubertal Boer goats. *Italia J Anim Sci* 9 (11): 50-53.
- Mahdiyah R. 2006. Pengaruh Penambahan FSH dan LH dalam Medium Maturasi terhadap Maturasi terhadap Oosit Sapi *In Vitro*. [Skripsi]. Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.
- Mardhiana D. 2001. Perkembangan Folikel pada Berbagai Status Ovarium Domba. [skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Mohammed AEN, Al-Suwaiegh S, Al-Shaheen T. 2019. Effect of follicular fluid component on oocyte maturation and embryo development *in vivo* and *in vitro*. *Adv Anim Vet Sci* 7 (5): 346-355.
- Revelli A, Piane LD, Casano S, Molinari E, Massobrio M, Rinaudo P. 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrin* 7 (40): 1-13.
- Romero-Arrendondo A, Seidel Jr GE. 1996. Effect of follicular fluid during *in vitro* maturation of bovine oocytes on *in vitro* fertilization and early embryogenic development. *Biol of Reprod* 55: 1012-1016.
- Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Saito T, Hiroi M. 2000. Hyaluronan in follicular fluids and fertilization of oocytes. *Fertil Steril* 74 (6): 1148-1152.
- Sun FJ, Holm P, Irvine B, Seamark RF. 1994. Effect of sheep and human follicular fluid on the maturation of sheep oocyte *in vitro*. *Theriogenology* 41 (4): 981-988.
- Tabatabaei S, Mamoei M. 2011. Biochemical composition of blood plasma and follicular fluid in relation to follicular size in buffalo. *Comp Clin Pathol* 20: 441-445.
- Ubaidullah LAL, Sohail A, Shoaib S, Khan Y. 2009. *In vitro* maturation oocyte in different maturation media containing oestrus buffalo serum, oestrus cow serum and follicular fluid buffalo. *Pakistan J Zool* 9: 213-218.
- Wattimena J, Saija ME. 2005. Pengaruh jenis hormon terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. *Anim Prod* 7 (3): 194-197.
- Wattimena J. 2006. Pengaruh serum domba estrus dan serum domba bunting terhadap produksi embrio domba *in vitro*. *JITV* 2 (11): 116-122.
- Wattimena J, Tagama TR, Hadisusanto B. 2006. Pengaruh jenis dan konsentrasi serum terhadap tingkat maturasi oosit domba *in vitro*. *Anim Prod* 8 (2): 94-99.
- Widayati DT, Fatmawati DH, Ariesta N, Kustono. 2014. Penggunaan Cairan Folikel dalam Media Maturasi *In Vitro* Oosit Kambing Bligon. *Jurnal Kedokteran Hewan* 8 (1): 1-4.