

Kompetensi Perkembangan Oosit Kambing Kacang dengan Diameter Berbeda pada Medium yang Disuplementasi Cairan Folikel

(*DEVELOPMENTAL COMPETENCE OF KACANG GOAT OOCYTES WITH DIFFERENT DIAMETER ON MEDIUM WITH FOLLICULAR FLUID SUPPLEMENTATION*)

Ali Harris¹, Sri Rahayu², Gatot Ciptadi³

¹Program Pascasarjana Biologi, ²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

³Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya Malang. Jl. Veteran, Malang 65145, Jawa Timur.
Tlpn: (0341) 551611 Fax: (0341) 565420 Email : haris.alidz@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian bertujuan mengetahui kompetensi perkembangan oosit kambing lokal dengan diameter berbeda pada medium dengan suplementasi cairan folikel. Ovarium diperoleh dari Rumah Pematangan Hewan, Kota Malang. Ovarium dicuci dan ditampung dalam larutan NaCl pada suhu 32-35°C yang telah ditambah streptomycin dan penicillin. Oosit diperoleh melalui aspirasi folikel menggunakan *syringe* 10 mL dan *needle* 18G. Oosit dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan diameter yaitu kelompok-1 (diameter di bawah 160,5 µm), kelompok-2 (160,5-170,0 µm) dan kelompok-3 (diameter di atas 170,0 µm). Cairan folikel diperoleh dengan melakukan *pooling* cairan folikel kambing berdiameter 3-8 mm. Medium maturasi menggunakan *tissue culture medium*-199 + 10% cairan folikel. Oosit dimaturasi selama 26 jam pada 39°C dan 5% CO₂ kelembaban maksimum. Kompetensi perkembangan oosit yang diamati meliputi tingkat ekspansi sel kumulus dan tingkat maturasi inti. Hasil penelitian menunjukkan bahwa oosit yang termasuk dalam kelompok-2 dan 3 memiliki jumlah paling banyak mencapai ekspansi kumulus tingkat 1 (63,8 dan 74%) dan metafase II (56,6% dan 68,5%). Dapat disimpulkan bahwa diameter oosit berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit dan dapat dipertimbangkan sebagai kriteria seleksi oosit.

Kata-kata kunci : kompetensi perkembangan, diameter oosit kambing, cairan folikel

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the developmental competence of local goats oocytes on the basis of their diameter in the medium supplemented with follicular fluid. Ovaries obtained from Slaughterhouse, Malang City were collected and washed with NaCl containing streptomycin and penicillin at 32-35°C. Oocytes were obtained by follicular aspiration using a 10 ml syringe and needle 18 G needle. Oocytes were then divided into 3 groups on based at their diameter, group 1 (<160,5 µm), group 2 (160,5-170,0µm) and group 3 (> 170,0µm). Follicular fluid was obtained by pooling the goat follicular fluid from follicles which have 3-8 mm in diameter. Maturation medium used was TCM-199 + 10% follicular fluid. Oocytes matured for 26 hours at 39°C and 5% CO₂ with maximum humidity. Observation of oocyte developmental competence includes level cumulus cell expansion and maturation level of the nucleus. The results showed that the oocytes in groups 2 (160,5-170,0µm) and 3 (> 170,0µm) have a maximum of cumulus expansion level 1 (63,8 and 74%) and metaphase II (56,6% and 68,5%). It is concluded that the diameter of oocytes had an influence on oocyte developmental competence (p <0,05), and can be considered for oocytes selection criteria.

Key words: developmental competence, goat oocyte diameter, follicular fluid

PENDAHULUAN

Salah satu tahapan dalam *in vitro embryo production* (IVP) adalah *in vitro maturation* (IVM). Proses IVP merupakan *assisted reproduction technology* yang memungkinkan hewan bereproduksi melebihi dari kapasitasnya dan dimanfaatkan juga untuk memahami kontrol dan mekanisme maturasi oosit (Khatun *et al.*, 2010). Keberhasilan IVP ditentukan oleh suksesnya proses IVM (Wang *et al.*, 2007).

Komponen utama keberhasilan proses IVM adalah penggunaan oosit yang seragam dan penggunaan medium yang mendukung maturasi oosit. Kandungan medium dalam proses IVM dibuat semirip mungkin dengan kondisi *in vivo* dengan menambahkan serum, protein, hormone, atau dengan suplementasi cairan folikel (Isobe dan Terada, 2001). Cairan folikel diketahui mengandung *peptide growth factor* (Nicolas *et al.*, 2005), *insulin-like growth factor binding protein*, *follicle stimulating hormone* (FSH), *luteinizing hormone* / LH (Avery *et al.*, 2003) dan estradiol (Deshpande dan Pathak, 2010) yang mendukung dalam maturasi oosit. Wahjuningsih dan Djati (2012) juga melaporkan bahwa cairan folikel mengandung protein *extracellular-regulated kinase 2* (ERK2) dan protein p90rsk yang berperan dalam proses pengontrolan meiosis dan maturasi oosit.

Oosit untuk keperluan IVM diperoleh dengan melakukan seleksi terhadap oosit hasil aspirasi folikel. Secara umum, kriteria seleksi oosit didasarkan pada jumlah lapisan sel kumulus (Heleil dan Fayed, 2010). Namun, seleksi berdasarkan kriteria sel kumulus belum dapat menghasilkan maturasi oosit secara maksimal. Menurut Lucas *et al.*, (2002) seleksi oosit berdasarkan sel kumulus bersifat subjektif, sehingga masih diperoleh oosit yang beragam. Keadaan tersebut diduga karena adanya keragaman kondisi fisiologi sitoplasma dan nukleus pada oosit hasil aspirasi yang ditunjukkan dengan perbedaan diameter yang dimiliki (Lucas *et al.*, 2002). Sementara itu Armstrong (2001) dan Pujol *et al.*, (2004) menyatakan bahwa hanya pada ukuran tertentu oosit memiliki kemampuan untuk berkembang setelah diproses secara *in vitro*. Menurut Ledda *et al.*, (1999), kemampuan oosit untuk berkembang mencapai metafase II dipengaruhi oleh diameter oosit. Hasil penelitian lain mengenai kemampuan perkembangan oosit pada babi (Lucas *et al.*, 2002), sapi (Lequarre *et*

al., 2005) dan unta (Khatir *et al.*, 2007) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh diameter oosit terhadap kemampuan perkembangan oosit. Kondisi tersebut menunjukkan bahwa kriteria seleksi oosit untuk keperluan IVM selain melihat sel kumulus, perlu juga mempertimbangkan ukuran diameter oosit (Arlotto *et al.*, 1996; Lucas *et al.*, 2002). Penelitian ini bertujuan untuk melihat kompetensi perkembangan oosit kambing lokal dengan diameter berbeda pada medium yang disuplementasi cairan folikel.

METODE PENELITIAN

Seleksi dan Pengukuran Oosit

Ovarium diperoleh dari RPH, Kota Malang, Jawa Timur. Ovarium dibersihkan dan ditampung pada botol yang berisi 200 mL larutan NaCl yang telah ditambahkan 0,01 g streptomycin dan 0,006 g penicillin. Botol dimasukkan pada termos bersuhu 32-35°C dan langsung dibawa menuju laboratorium. Oosit diperoleh dari aspirasi folikel berukuran 3-7 mm menggunakan spuit 10 mL dengan jarum suntik 18 G. Oosit hasil aspirasi diseleksi berdasarkan jumlah lapisan sel kumulus berdasarkan kriteria Wang *et al.*, (2007). Oosit hasil seleksi berdasarkan sel kumulus kemudian diukur diameternya menggunakan *micrometer eyepiece* (Griffin *et al.*, 2006) dan dikelompokkan menjadi tiga kelompok berdasarkan Harris *et al.*, (2014) yaitu kelompok 1 (di bawah 160,5 µm), kelompok 2 (160,5-170,0 µm), dan kelompok 3 (di atas 170,0µm). Penentuan diameter oosit pada penelitian ini dilakukan dengan mengukur diameter oosit beserta zona pellusida (Lucas *et al.*, 2002).

Pengumpulan Cairan Folikel

Cairan folikel yang digunakan adalah cairan folikel kambing yang diperoleh dari folikel ovarium kambing berukuran 3-8 mm dengan sistem *pooling* (Isobe dan Terada, 2001). Pengumpulan dan penyimpanan cairan folikel mengikuti metode Haque *et al.*, (2012) dengan modifikasi. Cairan folikel yang terkumpul disentrifus 3000 rpm selama 20 menit dan disaring menggunakan *millipore filter* 0,22 µm (*Sartorius stedim*). Cairan folikel diinaktivasi di dalam penangas air pada suhu 56°C selama 30 menit, kemudian disimpan pada *freezer* bersuhu -20°C.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan sidik ragam *analysis of variance* selang kepercayaan 95%. Jika ditemukan perbedaan dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan. Data dianalisis menggunakan *software* SPSS versi 20.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hubungan Diameter Oosit dengan Ekspansi Sel Kumulus

Hasil yang diperoleh disajikan pada Tabel 1, menunjukkan bahwa jumlah oosit yang paling banyak mencapai tingkat ekspansi 1 adalah oosit kelompok 3 (74%), diikuti oleh kelompok 2 (63,8%) dan kelompok 1 (44,4%). Sementara itu jumlah oosit yang paling banyak berada pada tingkat ekspansi 2 dan ekspansi 3 adalah oosit yang termasuk dalam kelompok 1 (<160,5 µm) yaitu masing-masing 24,1% dan 31,5%. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa diameter oosit berpengaruh terhadap kemampuan ekspansi sel kumulus (p<0,05%). Keadaan tersebut terlihat dari jumlah oosit yang mencapai ekspansi tingkat 1 meningkat seiring dengan meningkatnya diameter oosit. Kondisi tersebut mengindikasikan bahwa antar kelompok diameter oosit memiliki perbedaan kompetensi perkembangan, yang menunjukkan terdapat perbedaan kondisi fisiologi intraseluler. Hal tersebut dinyatakan oleh Ledda *et al.*, (1999) bahwa selama proses pertumbuhan oosit, oosit mengalami modifikasi intraseluler. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini juga sejalan dengan laporan Evecen *et al.*, (2010) bahwa diameter oosit berkaitan dengan kompetensi perkembangan oosit.

Pengamatan tingkat ekspansi kumulus dilakukan karena ekspansi kumulus merupakan salah satu indikator oosit telah matang. Gordon (1994) dan Rahman *et al.*, (2008) menyatakan bahwa ekspansi sel kumulus dapat digunakan sebagai penanda maturasi oosit. Pernyataan tersebut diperkuat juga oleh penelitian Ciptadi *et al.*, (2005) yang menunjukkan bahwa koefisien korelasi antara ekspansi sel kumulus dengan kompetensi perkembangan oosit adalah 0,58-0,86. Nilai koefisien korelasi tersebut menunjukkan bahwa ekspansi sel kumulus erat kaitannya dengan maturasi oosit. Kondisi ini menyebabkan banyak peneliti menggunakan derajat ekspansi kumulus dan *polar body* sebagai indikator oosit telah matang. Hal ini dapat terjadi karena sel kumulus berperan dalam proses perkembangan dan maturasi oosit (Gilchrist *et al.*, 2008). Pada proses maturasi oosit, sel kumulus berperan sebagai mediator transpor energi, mikronutrisi, molekul (Cecconi *et al.*, 2008) dan hormon yang diperlukan dalam dalam proses perkembangan dan maturasi oosit melalui *gap junction communication*. Kondisi ini menunjukkan bahwa keberadaan sel kumulus sangat penting untuk proses tumbuh dan perkembangan oosit serta berperan dalam proses maturasi oosit.

Hubungan Diameter Oosit dengan Tingkat Maturasi Inti

Pada Tabel 2 disajikan bahwa diameter oosit berpengaruh secara signifikan terhadap tingkat maturasi inti (p<0,05). Pada Tabel 2 ditunjukkan bahwa oosit kelompok 3 adalah kelompok oosit yang paling banyak mencapai tahap M-II yaitu sebanyak 68,5% dan diikuti oleh kelompok 2 sebanyak 56,6%. Namun,

Tabel 1. Hubungan diameter oosit kambing lokal dengan ekspansi sel kumulus

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Tingkat Ekspansi Kumulus		
		1	2	3
Kelompok 1 (<160,5 µm)	54	4,8±0,84 ^a (44,4%)	2,6±0,55 ^a (24,1%)	3,4±0,55 ^b (31,5%)
Kelompok 2 (160,5-170,0 µm)	94	12,0±1,22 ^b (63,8%)	3,6±1,34 ^a (19,2%)	3,2±0,84 ^b (17%)
Kelompok 3 (>170,0 µm)	73	10,8±2,59 ^b (74%)	2,4±1,67 ^a (16,4%)	1,4±0,89 ^a (9,6%)

Keterangan : Nilai menunjukkan rata-rata±simpangan baku dan persentase. Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata (p<0,05)

Tabel 2. Hubungan diameter oosit kambing lokal dengan tingkat maturasi inti

Diameter Oosit	Jumlah Oosit	Maturasi Inti				
		GV	GVBD	M-I	M-II	TI
Kelompok 1 (<160,5 µm)	24	1,4±0,89 ^b (29,2%)	1±1 ^a (20,8%)	1±1 ^a (20,8%)	1,4±1,14 ^a (29,2%)	0±0 (0%)
Kelompok 2 (160,5-170,0 µm)	60	0,2±0,45 ^a (1,7%)	2±1 ^a (16,7%)	2,6±0,89 ^b (21,7%)	6,8±1,1 ^b (56,6%)	0,4±0,55 (3,3%)
Kelompok 3 (>170,0 µm)	54	0,2±0,45 ^a (2%)	0,8±0,84 ^a (7,4%)	1,8±1,1 ^{ab} (16,6%)	7,4±1,67 ^b (68,5%)	0,6±0,55 (5,5%)

Keterangan : GV: *germinal vesicle*; GVBD: *germinal vesicle breakdown*; M-I: metafase I; M-II; metafase II; TI: tidak teridentifikasi. Nilai menunjukkan rata-rata±simpangan baku dan persentase. Notasi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($p < 0,05$)

antara kelompok 2 dan 3 tidak berbeda nyata. Sementara itu oosit kelompok 1 banyak tertahan pada fase GV (29,2%) dan GVBD (20,8%). Perbedaan hasil yang diperoleh antara kelompok 1, 2, dan 3 menunjukkan antar kelompok tersebut terdapat perbedaan kemampuan perkembangan.

Perbedaan kemampuan mencapai metafase II antar oosit yang memiliki perbedaan diameter mengindikasikan adanya perbedaan kondisi intraseluler yang berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit dalam mencapai maturasi inti. Berdasarkan hasil yang diperoleh, menunjukkan bahwa oosit yang termasuk pada kelompok 3 dan 2 memiliki kompetensi perkembangan yang lebih baik dalam mencapai maturasi inti bila dibandingkan dengan oosit kelompok 1. Hasil ini menunjukkan bahwa oosit yang termasuk dalam kelompok 3 dan 2 memiliki kondisi intraseluler yang telah siap untuk memasuki tahap metafase II bila dibandingkan dengan kondisi intraseluler oosit pada kelompok 1. Hal ini mengindikasikan bahwa oosit yang termasuk dalam kelompok 1 masih dalam proses pertumbuhan, sehingga kondisi intraseluler yang meliputi nukleus dan sitoplasma belum memiliki kemampuan untuk menyelesaikan proses mencapai metafase II. Hal inilah yang menyebabkan masih banyak oosit yang termasuk dalam kelompok 1 hanya mencapai GV dan GVBD.

Kondisi ini sejalan dengan pernyataan Evecen *et al.*, (2010) bahwa oosit membutuhkan modifikasi intraseluler sebelum memiliki kemampuan dalam menyelesaikan maturasi inti, fertilisasi, dan pembentukan embrio. Keadaan tersebut dinyatakan pula oleh Ledda *et al.*, (1999) dan Lucas *et al.*, (2002) yang

melaporkan bahwa selama oosit tumbuh, terjadi perubahan kondisi intraseluler pada nukleus dan sitoplasma yang memengaruhi kemampuan perkembangan oosit.

Perubahan kondisi intraseluler yang terjadi pada oosit yang sedang tumbuh, berpengaruh juga terhadap diameter oosit. Perubahan kondisi intraseluler yang terjadi pada oosit dapat berupa terjadinya akumulasi ion, karbohidrat dan meningkatkannya jumlah organel seperti ribosom dan mitokondria yang berpengaruh juga terhadap peningkatan volume dan diameter oosit (Fair *et al.*, 1997; Hyttel *et al.*, 1997; Johnson dan Everitt, 2007). Perubahan kondisi fisiologi intraseluler pada oosit tersebut selain berperan dalam maturasi oosit, berperan juga dalam proses fertilisasi dan perkembangan oosit mencapai embrio (Johnson dan Everitt, 2007). Hasil penelitian yang diperoleh sejalan dengan hasil penelitian yang dilaporkan oleh Lucas *et al.*, (2002) pada babi, Lequarre *et al.*, (2005) pada sapi, Khatir *et al.*, (2007) pada unta, dan Evecen *et al.*, (2010) pada anjing yang menunjukkan bahwa oosit dengan diameter yang lebih besar memiliki kemampuan perkembangan yang lebih baik.

Hasil dari penelitian ini juga sejalan dengan hasil penelitian Haque *et al.*, (2012) dan Da Costa *et al.*, (2013) yang menunjukkan bahwa suplementasi cairan folikel dapat mendukung perkembangan maturasi oosit. Kondisi tersebut karena cairan folikel mengandung materi yang dapat mendukung dan menstimulasi perkembangan oosit (Malekshah *et al.*, 2005). Hal ini seperti yang dinyatakan oleh Wahjuningsih dan Djati (2012) bahwa cairan folikel dapat digunakan sebagai bahan suplementasi dalam maturasi *in vitro*.

SIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa diameter oosit berpengaruh terhadap kompetensi perkembangan oosit, dan diameter oosit dapat digunakan sebagai kriteria pendukung dalam proses seleksi oosit.

SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan pewarnaan *brilliant cresyl blue* kemudian dilakukan pengukuran diameter untuk mengetahui secara lebih spesifik pada ukuran berapa oosit telah menyelesaikan pertumbuhannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari penelitian yang dibiayai oleh Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi (Depdikbud-DP2M-Dikti/ RUPTN-UB No: DIPA 023042414989/2013.

DAFTAR PUSTAKA

- Amstrong DT. 2001. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology* 55: 1303-1322.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML. 1996. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 943-956.
- Avery B, Strobeck L, Jacobsen T, Bogh IB, Greve T. 2003. *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid, effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology* 59: 987-999.
- Boediono A, Rusiyantono Y, Mohamad K, Djuwita I, Sukra Y. 1999. Produksi embrio kambing dengan teknologi maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. Seminar Nasional Peternakan dan Veteriner. Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan. Bogor.
- Cecconi S, Mauro A, Capacchietti G, Berardinelli P, Bernabò N, Di Vincenza AR, Mattioli M, Barboni B. 2008. Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocyte is induced by paracrine factor(s) released by gonadotropine-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen activated protein kinase activation. *Endocrinology* 149: 100-107.
- Ciptadi G, Sutiman SB, Boediono A, Djati MS, Susilawati T, Siswanto B. 2005. Perkembangan *In Vitro* Oosit Rekonstruksi Hasil Transfer Nukleus Menggunakan Sel Kumulus (Disertasi). Malang. Universitas Brawijaya.
- Da Costa N, Wahjuningsih S, Isnaini N. 2013. Supplementation with goat follicular fluid in the in vitro maturation medium toward cumulus expansion and nucleus transformation. *Journal of Biologi Agriculture and Healthcare* 3 (3): 108-113.
- Deshpande SB, Pathak MM. 2010. Hormonal and biochemical profiles in follicular fluid of ovulated follicles in superovulated goats ovaries. *Veterinary Word* 3 (5): 221-223.
- Evecen M, Cirit U, Demir K, Karaman E, Bakirer G, Hamzaoglu AI, Birlir S, Pabuccuoglu S. 2010. Effect of oocyte diameter on *in vitro* embryo production in dogs. *Research Article* 16 (6): 947-950.
- Fair T, Hulshof SCJ, Hyttel P, Greve T. 1997. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy Embryo* 195: 327-336.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. 2008. Oocyte-secreted factors: regulation of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction* 14(2):159-177.
- Gordon I. 1994. *Laboratory production of cattle embryos*. Dublin. Ireland. Department of Animal Science and Production. University College.
- Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. 2006. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 3: 2.

- Haque SAM, Khandoker MAMY, Kabiraj SK, Asad LY, Fakruzzaman M, Tareq KMA. 2012. Effect of goat follicular fluid *in vitro* production of embryos in Black Bengal Goats. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 2(3): 287-294.
- Harris A, Ciptadi G, Rahayu S. 2014. The morphological measurement of immature oocyte obtained from follicle different size in Indonesian local goat. *International Journal of Biosciences*. 4(4): 211-216.
- Heleil B, Fayed M. 2010. Developmental competence of buffalo oocytes from follicles of different diameters selected by brilliant cresyl blue staining. *Global Veterinaria* 4: 176-184.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32.
- Isobe N, Terada T. 2001. Effect of bovine follicular fluid added to the maturation medium on sperm penetration in pig oocytes matured *in vitro*. *Journal of International Development and Cooperation* 7(1): 59-66.
- Johnson MH, Everitt BJ. 2007. *Essential Reproduction*. Australia. Blackwell Publishing.
- Khatir H, Carolan C, Lonergan P, Mermillod P. 1997. Characterization of calf follicular fluid and Its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocyte. *Journal of Reproduction and Fertility* 111(1): 267-275.
- Khatun M, Mohammad MUB, Jalal UA, Aminul H, Mohammd BR, Mohammed S. 2010. In vitro maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black bengal goat oocytes. *Journal of Veterinary Science* 12(1): 75-82.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. 1999. Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. *Reprod Nutr Dev* 39: 503-508.
- Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Dalbies-Tran R, Callsen H, Mermillod P. 2005. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63: 841-859.
- Lucas X, Martinez EA, Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology* 57: 871-885.
- Malekshah AK, Moghaddam AE. 2005. Follicular fluid and cumulus cells synergistically improve mouse early embryo development *in vivo*. *J. Reproduction and Development* 51: 195-199
- Nicolas MO, Leese G, Picton HM, Harris SE. 2005. Fluctuation in bovine ovarian follicular fluid composition throughout the oestrous cycle. *Reproduction* 129:219-228.
- Pujol M, Lopez-Bejar M, Paramio MT. 2004. Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) Test. *Theriogenology* 61: 735-744.
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Khadijah WEW. 2008. In vitro maturation of oocytes with special reference to goat: A. Review. *Biotechnology* 7: 599-611.
- Wahyuningsih S, Djati S. 2012. Protein expression of goat follicular fluid (GFF). *Journal of Agricultural Science and Technology* 2: 917-920.
- Wang ZG, Zu ZR, Yu SD. 2007. Effects of oocytes collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *J Anim Sci* 52(1): 21-25.