

Peran *Transforming Growth Factor* β terhadap Tingkat Kematangan dan Kejadian Apoptosis Oosit Sapi pada kultur *In Vitro*

*THE ROLES OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR β
ON IN VITRO MATURATION AND APOPTOSIS PROCESS*

Widjiati¹, Rimayanti¹, Arief boediono², Agus Setiadi²

¹Fakultas Kedokteran Hewan Unair, Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115, Telp. 031.5992785, Fax. 031.5993015, Email : widjiati@yahoo.com

²Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Kampus Dramaga Jln Agatis Dramaga Bogor 16680, Telp/ Fax (0251) 625959

ABSTRACT

Low productivity of *in vitro* embryo production at blastosis level appears to be as a result of imperfect oocyte maturation which causes imperfect oocyte growth, and in turn will affect the embryo growth. In addition to hormonal factor, growth factor plays significant role in maturation process of oocytes. As growth factor might has a significant role during maturation process, a study was conducted to determine whether transforming growth factor β (TGF β) isolated from oocytes of cumulus complex is required for co culture and *in vitro* embryo production.. Oocytes were collected from follicles with the diameter of 3-5 mm and > 5 mm. Then the oocytes were cultured for 22 hours at 38.5° with 5% CO₂ atmosphere in tissue culture medium (TCM) 199 supplemented with 5 μ g/mg luteonizing hormone (LH), 3% bovine serum albumin (BSA) 50 μ g/ml gentamycin sulfat and three different levels of TGF β (12,85 pg/ml, 25,7 pg/ml and 38,55 pg/ml). The oocyte maturation and number of apoptosis cells were examined. The result showed that oocyte maturation in medium supplemented TGF β at the dose of 38,55 pg/ml was better than in that at dose of 12,85pg/ml or 25,7 pg/ml. The best maturation was observed at metaphase II stage of oocyte development. No apoptosis was observed during maturation of oocytes. Supplementation of TGF β at the dose of 38,55 pg/ml in culture medium increased the oocyte maturation without causing a significant apoptosis *in vitro*.

Keywords: TGF β , apoptosis, cumulus complex,

PENDAHULUAN

Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produksi embrio *in vitro* adalah hasil maturasi oosit yang heterogen sehingga menyebabkan proses pematangan (kapasitasi) tidak berjalan sempurna (Hytell *et al.*, 1997). Ekspansi kumulus sangat menentukan kematangan oosit, mengingat kumulus mengandung berbagai bahan aktif yang diperlukan oosit selama meiosis. Pada proses ekspansi kumulus selain dipengaruhi oleh hormon juga dipengaruhi oleh *growth factor* (faktor pertumbuhan). Penambahan faktor pertumbuhan ke media pematangan dan media pembiakan mengatur perkembangan oosit antara lain meningkatkan proliferasi dan diferensiasi sel kumulus (Margawati, 1999).

Faktor pertumbuhan adalah *hormone-like polypeptide* dan protein, yang bekerja secara parakrin dan autokrin yang merangsang aktivitas mitogenik pada jaringan yang mengalami proliferasi seperti transformasi folikel ovarium menjadi korpus luteum (Hafez, 2000).

Salah satu dari faktor pertumbuhan yang dihasilkan folikel pada mamalia adalah *Transforming Growth Factor* β (TGF β). Menurut Frandson (1992) bahwa *growth hormone* mempunyai pengaruh penting dalam meningkatkan sekresi protein pada cairan folikel, karena *growth hormone* mempunyai peran dalam meningkatkan transpor asam amino melintasi membran sel serta meningkatkan pengikatan asam-asam amino hingga terbentuk protein.

TGF β memiliki banyak peran pada kultur sel, antara lain mempengaruhi proses pematangan oosit. TGF β mempunyai efek menurunkan produksi cAMP yang dihasilkan oleh oosit kumulus kompleks (OKK). Peningkatan level cAMP akan menghalangi pematangan oosit. (Feng *et al.*, 1988; Saragueta *et al.*, 2002; Vitt *et al.*, 2000).

TGF β sangat mempengaruhi fungsi sel granulosa sehingga apabila terjadi ekspresi prematur atau over ekspresi dari reseptor TGF β dalam membran sel granulosa akan menyebabkan perubahan mekanisme kerja TGF β pada sel granulosa. (Godkin dan Dore, 1998; Osterland dan Fried, 2000)

Menurut Prochazka *et al.*, (2003) TGF β mempunyai peran penting merangsang perluasan OKK. TGF β dengan aktivitas *tyrosin kinase* diaktifkan oleh ikatan TGF β , dan menghasilkan TGF β *autophosphorylase* dan *tyrosine phosphorylase* yang berasal dari banyak substrat di dalam sel tersebut. TGF β *tyrosine phosphorylase* memungkinkan interaksi antara pertukaran protein dan pengaktifan beberapa substrat *tyrosin kinase*. Melalui substrat-substrat tersebut OKK merespon EGF melalui TGF β dengan aktivitas *tyrosin kinase* untuk merangsang perluasan OKK terutama sel-sel kumulus.

Secara *in vitro*, TGF β dan *Folicle Stimulating Hormone* (FSH) membantu dispensi kumulus pada OKK pada tikus, babi, sapi, dan kelinci. Perluasan OKK diikuti dengan peningkatan asam hyaluronat yang diperkaya matriks ekstraselular dan modifikasi *gap junction* antara sel kumulus dan oosit. Selanjutnya, terjadi pelepasan kompleks kumulus oosit dari folikel selama ovulasi. Oosit dewasa ditangkap oleh fimbria oviduk dan oviduk akan memelihara kelangsungan hidup oosit. Perkembangan sel-sel kumulus menciptakan lingkungan mikro (*microenvironment*) yang sesuai untuk pengaktifan dan motilitas sperma.

Produksi asam hyaluronat secara signifikan meningkat di dalam OKK dengan bantuan FSH atau TGF β . Peningkatan kemampuan OKK dalam memproduksi asam hyaluronat berhubungan erat dengan TGF β dan FSH (Prochazka *et al.*, 2003).

Ekspansi kumulus sangat dipengaruhi oleh proliferasi sel, penurunan proliferasi sel kumulus akan mempengaruhi kematangan oosit secara keseluruhan. Penurunan proliferasi sel kumulus diindikasikan adanya kematian sel,

oleh karena itu perlu diketahui terjadinya apoptosis pada sel kumulus untuk menentukan kualitas oosit yang dihasilkan.

Apoptosis terjadi selama masa pertumbuhan sebagai mekanisme homeostatik untuk mempertahankan populasi sel dalam jaringan. Walaupun secara detail pemahaman jalur-jalur sinyal yang menstimulasi apoptosis masih belum lengkap, namun proses ini dikontrol oleh beberapa protein kompleks, yang diaktivasi oleh berbagai jenis stimulan. Salah satu regulator penting pada mekanisme apoptosis adalah protein BCL-2. Ekspresi BCL-2 yang berlebihan dapat melindungi limfosit dari apoptosis dan memungkinkan sel tersebut berproliferasi. Bila ekspresi BCL-2 menurun maka protein proapoptosis seperti Bax akan meningkat. Keseimbangan antara BCL-2 dan Bax memainkan peran penting untuk memelihara keseimbangan kelangsungan hidup dan kematian sel yang menjadi esensi dari determinasi potensi apoptosis dari sel. Aktivitas apoptosis yang tinggi selalu dihubungkan dengan tingkat rasio BCL-2/Bax (Cotran *et al.*, 2000). Oleh karena itu penting mengetahui pengaruh suplementasi TGF β dalam medium maturasi *in vitro* oosit sapi terhadap meningkat kematangan dan apoptosis.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah meningkatkan kualitas oosit yang dihasilkan secara *in vitro* dan mengoptimalkan produksi embrio sapi untuk keperluan *transfer embrio* dengan memanfaatkan limbah rumah potong hewan sebagai sumber sel telur. Secara khusus tujuan penelitian ini mengamati efek suplementasi TGF β terhadap tingkat kematangan oosit dan apoptosis.

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian ini adalah ovarium sapi potong yang diambil dari Rumah Potong Hewan (RPH). Oosit sapi dengan kumulus kompleks diperoleh dengan melakukan aspirasi pada folikel ukuran 3-5 mm dan >5 mm kemudian dilakukan proses maturasi *in vitro*. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan tingkat kematangan dan jumlah oosit yang mengalami apoptosis.

Prosedur Pengumpulan Data Penelitian Koleksi Oosit

Ovarium sapi dari Rumah Potong Hewan dan disimpan dalam NaCl 0,89% yang telah diberi tambahan gentamycin sulfat 50 μ g/ml,

pada suhu 30-35°C. Oosit diambil dengan metode aspirasi dengan menggunakan jarum ukuran 18 G yang dihubungkan dengan spuit 10 ml berisi 1 ml *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang telah diberi tambahan 0,3% *Bovine Serum Albumine* (BSA) dan 50 µg/ml gentamycin. Aspirasi dilakukan pada folikel ukuran 3-5 mm dan >5 mm. Oosit dicuci secara berturut-turut sebanyak 3 kali di dalam medium PBS dan 2 kali di dalam *Tissue Buffer Culture* (TCM) 199.

Suplementasi TGF β pada Kultur *In Vitro* Oosit Sapi

Proses maturasi oosit dilakukan dalam medium TCM yang ditambahkan 0,01 µg/ml FSH, 5% bovine serum albumin (BSA) dan 50 µg/ml gentamycin sulfat. Dosis suplementasi TGF β masing-masing 12,85 pg, 25,7 pg dan 38,55 pg (Widjiati,2007). Dua puluh oosit berdasarkan ukuran dan kelompoknya dikultur dalam 100 µl medium tetes dan ditutup dengan mineral oil. Pematangan oosit dilakukan pada suhu 38°C di dalam inkubator CO₂ 5% selama 22 jam (Pawshe *et al.*, 1996).

Pemeriksaan Tingkat Kematangan Oosit Setelah Maturasi *In Vitro*

Setelah 22 jam maturasi *in vitro*, oosit difiksasi didalam asam asetat : etanol (1 : 3) selama 4-5 hari. Selanjutnya diwarnai *arctocarcein* 1% kemudian dibilas dengan larutan peluntur. Oosit diperiksa dibawah mikroskop fase kontras untuk menentukan persentase oosit yang berkembang sampai tahap metafase II berdasarkan kelompok perlakuan (Watson *et al.*, 2000).

Pemeriksaan Apoptosis Sel Setelah Maturasi *In Vitro*

Oosit yang telah dimaturasi, masing-masing 20 oosit pada setiap kelompok selanjutnya difiksasi dengan formalin buffer 10%. Kemudian difiksasi pada gelas objek yang sudah dilabel dengan polilisin dan ditutup dengan gelas cover. Kemudian dilakukan dehidrasi dan rehidrasi. Pengecatan menggunakan *apop Tag Kit*. Inti oosit yang apoptosis akan tampak berwarna coklat, sedangkan sel yang hidup berwarna hijau.

Analisis Data

Rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap (RAL). Pengumpulan data dilakukan dalam lingkungan yang terkontrol dan terkendali dengan asumsi semua kondisi sama. Data yang diperoleh dari tingkat kematangan oosit diuji dengan Anova dan jumlah oosit yang mengalami apoptosis dipersentase (Steel and Torrie, 1991)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Kematangan Oosit

Kultur oosit kumulus kompleks yang ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β, ukuran folikel, interaksi antara dosis dan ukuran folikel setelah dianalisis secara statistika berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap *metafase* II (Tabel 1 dan 2).

Kultur oosit kumulus kompleks yang tidak ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β dan ukuran folikel

Tabel 1. Pengaruh dosis terhadap perkembangan oosit asal folikel 3-5mm sampai tahap *Metafase* II pada kultur *in vitro* dengan penambahan TGF β dan hormon

Dosis TGF β (pg)	Perlakuan	
	Kumulus+hormon	Kumulus - hormon
0	1,67±1,15 ^a	1,00±0,00 ^a
12,85	2,33±0,57 ^a	2,33±0,57 ^{ab}
25,7	6,33±1,52 ^b	2,00±0,00 ^{bc}
38,55	7,32±0,57 ^b	3,33±0,57 ^c

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P,0<05)

berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi sedangkan variasi antara dosis dan ukuran folikel berpengaruh nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap metafase II.

Kultur oosit kumulus kompleks yang ditambahkan hormon pada medium kultur, dosis suplementasi TGF β , ukuran folikel, variasi antara dosis dan ukuran folikel berpengaruh sangat nyata terhadap tingkat kematangan oosit sapi mencapai tahap metafase II.

Proses pematangan inti berjalan bila sudah ada LH *surge*. Keberlangsungan proses maturasi, melibatkan banyak faktor yang berperan untuk sintesis protein disamping adanya *growth factor* seperti TGF dan lain-lain yang semuanya saling mendukung sehingga oosit mempunyai *meiotic competence*. Proses meiosis oosit diatur oleh *maturation promoting factor* (MPF), berupa protein kinase yang aktivitasnya memicu reaksi yang menyebabkan membran ini menghilang sehingga proses pematangan inti dimulai (Hendriksen *et al.*, 2000)

. *Meiotic competence* oosit erat hubungannya dengan ukuran folikel. Ukuran folikel antral mempunyai *meiotic competence* yang spesifik. Oosit sapi ukuran 3-5 mm mempunyai kemampuan menyelesaikan tahap germinal vesicle break down GVBD dan meiosis. Menurut Abdon (2001) oosit yang berasal dari folikel besar lebih mampu berkembang dari pada oosit dari folikel sedang, karena folikel besar mampu menyediakan lingkungan makro yang bisa menunjang kualitasnya.

Menurut Yang dan Roy (2001) tidak terdapat perbedaan antara folikel sedang dan folikel besar. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini bahwa tidak terdapat perbedaan kualitas oosit yang dikoleksi dari folikel sedang dan besar. Perlu diingat oosit yang dikoleksi dari folikel besar dari awal memang sudah memasuki tahap pematangan sehingga kemungkinan terjadi *over mature* adalah besar. Hasil penelitian terakhir menunjukkan bahwa oosit dari folikel dominan (>13 mm) menghasilkan oosit dengan kualitas yang tidak selalu terbaik dalam arti jumlah oosit yang mencapai tahap

Tabel 2. Perkembangan oosit asal folikel >5mm sampai tahap *Metafase* II pada kultur *in vitro* dengan penambahan TGF β dan hormon

Dosis TGF β (pg)	Perlakuan	
	Kumulus+hormon	Kumulus - hormon
0	0,67±0,47 ^a	0,67±0,94 ^a
12,85	5,00±0,00 ^b	1,67±0,94 ^a
25,7	5,00±0,00 ^b	2,00±0,82 ^a
38,55	5,00±0,00 ^b	4,67±0,47 ^b

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P,0<05)

Tabel 3. Prosentase oosit yang mengalami apoptosis setelah dimaturasi *in vitro* dengan suplementasi TGF β pada kelompok folikel 3-5 mm dan >5 mm

Kelompok folikel	Jumlah oosit hasil maturasi <i>in vitro</i>	Oosit yang mengalami apoptosis pada suplementasi TGF β			
		0 pg	12,85pg	25,7 pg	38,55 pg
3-5 mm	20	2 (10%) ^a	2 (10%) ^a	2 (10%) ^a	4 (20%) ^a
>5 mm	20	1 (5%) ^a	1 (5%) ^a	1(5%) ^a	2 (10%) ^a

Keterangan : *superscript* dengan huruf yang sama dalam kolom yang berbeda menunjukkan tidak ada perbedaan (P,0<05)

metafase II cukup tinggi tetapi belum tentu menghasilkan angka fertilitas juga tinggi.

Penambahan hormon FSH pada maturasi oosit secara *in vitro* berpengaruh terhadap peningkatan perkembangan oosit mencapai tahap *germinal vesicle*, *germinal vesicle break down*, *metafase I* dan *metafase II*, bila di dalam medium kultur tersebut sudah diinduksi dengan TGF β. Peningkatan ini berjalan seiring dengan peningkatan dosis induksi TGF β pada maturasi oosit dengan kumulus kompleks (Widjiati, 2007).

Pada kultur oosit dengan kumulus kompleks yang ditambah hormon dan TGF β dalam media kultur, peningkatan dosis suplementasi TGF β meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap metafase II, namun setelah diuji secara statistika lebih lanjut oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter folikel 3-5 mm dan penambahan dosis TGF β 38,55 pg memberikan tingkat kematangan oosit yang terbaik

Demikian juga pada kultur oosit dengan kumulus kompleks yang tidak ditambah hormon dalam media kultur, peningkatan dosis suplementasi TGF β meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap *metafase II*, namun setelah diuji secara statistika lebih lanjut oosit yang dikoleksi dari folikel dengan ukuran diameter folikel >5 mm dan penambahan dosis TGF β 38,55 pg memberikan tingkat kematangan oosit yang terbaik

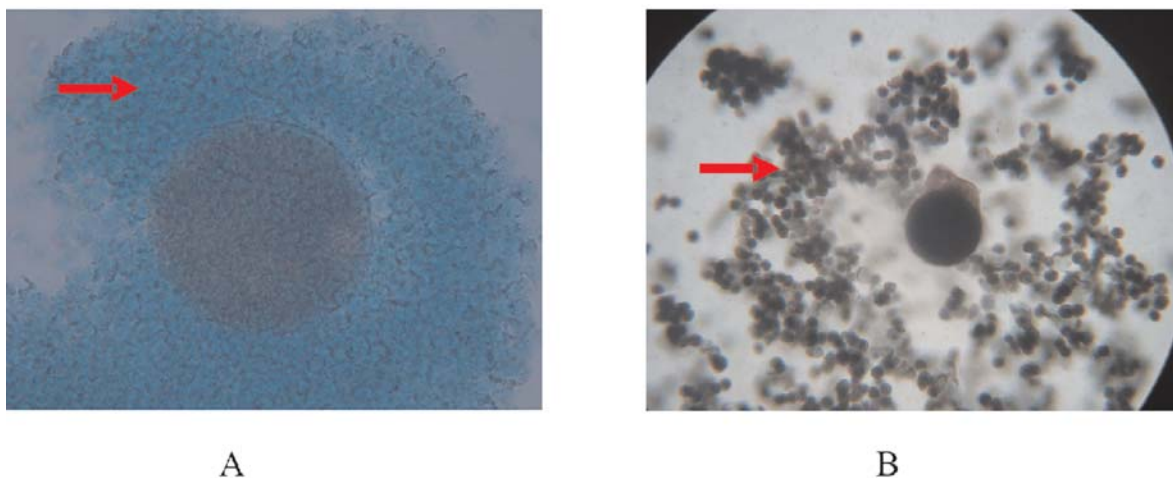
Hormon FSH, LH, dan estrogen sering digunakan dalam medium kultur untuk meningkatkan kualitas oosit (Beker *et al.*, 2000). Penambahan media maturasi dengan hormon-hormon ini bermula dari dugaan keterlibatan hormon-hormon ini dalam proses maturasi *in*

vivo. Namun demikian, folikulogenesis dan maturasi oosit diregulasi tidak hanya oleh gonadotropin dan steroid tetapi juga oleh beragam *cytokine* yang bekerja sebagai parakrin yang dihasilkan secara lokal. Di antara regulator ini terdapat beberapa faktor pertumbuhan antara lain TGF β (Beker *et al.*, 2000).

FSH merangsang sel kumulus mensekresi *estradiol*. FSH membutuhkan dua mediator penting yaitu estradiol 17β dan 17β, 20 β-*dihydroxy-4-pregmen 3-one* sebagai hormon-hormon penting masing-masing untuk melaksanakan pertumbuhan dan maturasi oosit. Sel kumulus memproduksi dua mediator *steroid* yang dipengaruhi oleh FSH. Perubahan *steroidogenesis* yaitu perubahan dari *estradiol* menjadi *estradiol 17β* dan 17β, 20 β-*dihydroxy-4-pregmen 3-one*, serta perubahan gen-gen oleh enzim *cytochrome P450* selama proses *aromatase* yang selanjutnya akan meningkatkan reseptor LH (Senthilkumaran *et al.*, 2004)

Oosit dan sel kumulus berperan penting dalam regulasi pensinyalan reseptor *estradiol* selama proses IVM. Reseptor estradiol menekan produksi cAMP selama meiosis. Sel kumulus sangat diperlukan untuk proses maturasi oosit dan fungsi regulasi oosit (Epig, 2004).

Oosit mensekresi GDF 9 yang merupakan *ligand* spesifik dari TGF β, yang selanjutnya memacu laju pertumbuhan folikel dan ovulasi (Juengel *et al.*, 2004). TGF β meregulasi proses pematangan dalam nukleus sehingga tanpa penambahan hormon secara eksternal, faktor-faktor di dalam oosit mampu melakukan regulasi proses meiosis (Juengel dan Naty, 2005).



Gambar 1. Oosit sapi yang tidak mengalami apoptosis (A), Oosit yang mengalami apoptosis (B)

Tingkat Apoptosis Oosit Setelah Maturasi *In Vitro*

Ukuran oosit dan suplementasi TGF β tidak berpengaruh terhadap terjadinya apoptosis. Maturasi oosit secara *in vitro* juga tidak menyebabkan terjadinya apoptosis, hal ini terlihat pada Tabel 3. Untuk lebih jelasnya gambaran apoptosis pada oosit dapat dilihat pada gambar 1.

Rangsangan apoptosis dibangkitkan oleh sinyal yang ditransmisikan melalui membran plasma ke dalam molekul pengatur intra sel, atau langsung menuju target yang berada di dalam sel. Sinyal bisa berupa sinyal transmembran sendiri, juga bisa berupa sinyal merangsang atau sinyal menghambat. Sinyal merangsang berupa Fas, TNF, dan lain-lain. Sinyal menghambat apoptosis berupa hormon pertumbuhan, sitokin, enzim tertentu, dan lain-lain.

SIMPULAN

Suplementasi *Transforming Growth Factor* β dosis 38,55 pg dalam medium kultur *in vitro* menghasilkan tingkat kematangan oosit yang terbaik

Suplementasi *Transforming Growth Factor* β pada proses maturasi oosit *in vitro* tidak menyebabkan apoptosis oosit.

SARAN

Perlu dipikirkan kedepan untuk memodifikasi medium kultur dengan penambahan *Transforming Growth Factor* β untuk meningkatkan kualitas oosit.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan ke Dikti yang telah mendanai penelitian ini melalui dana Penelitian Fundamental dengan No kontrak : 319/SP2H/PP/DP2M/III/2008

DAFTAR PUSTAKA

Beker ARCL, Izadyar F, Colenbrender B, Bevers MM. 2000. Effect of growth hormone releasing hormone (GHRH) and vasoactive intestinal peptide (VIP) on *in vitro* bovine oocyte maturation. *Theriogenology* 53: 1771-1782

Cotran R.S., Kuran V, Collin T. 2004. Cell Injury and Cell Death. *Robbins Pathologic Basic of Disease*. 7th Ed. WB Saunders Company Pp : 3-46.

Eppig J 2004. The role of the oocyte in regulating somatic cell function. Programme XIII International Workshop on the Development and function of the Reproductive Organs, 12-15 june, Copenhagen, Denmark. Pp : 1-5.

Feng P, Catt KJ, Knecht M. 1988. Transforming growth factor beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology*. 122 : 181 – 186

Frandsen, R.D. 1992. *Anatomi dan Fisiologi Ternak*. Edisi ke empat terjemahan B. Srigondo dan K. Prasno. Yogyakarta. Gajah Mada University Press. Pp : 683.

Hafez E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animal*. Philadelphia. Lea and Febiger.

Hyttel P, Fair T, Callsen H, Greve T. 1997. Oocyte Growth, Capacitation And Final Maturation In Cattle. *Theriogenology*. 47 : 23 – 32.

Juengel JI, Hudson NL, Whiting L, McNatty KP. 2004. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 70 : 557-561.

Juengel JI, Naty KP. 2005. The role of protein of the transforming growth factor β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reprod Update* 11 : 344-363

Margawati ET. 1999. The effective of growth factor on *in vitro* embryo development. *Media Veteiner* 6 (3) : 27 – 34

Saraggieta PE, Lanuza GM, Baranao J L. 2002. Autocrine role of transforming growth factor β 1 on rat granulose cell proliferation. *Biol Reprod* 66 : 1862 – 1868

Senthilkumaran B, Yoshikumi M, Nagahama Y. 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Biol Reprod* 215 : 11-18

Steel RGD, Torrie JH. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Suatu Pendekatan Biometrik. Jakarta. Penerbit PT. Gramedia. Pustaka Utama,

- Vitt UA, Hayashi M, Klein C, Hsueh AJW. 2000. Growth differentiation factor 9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod.* 62 : 370 – 377.
- Watson AJ, De Sousa P, Caveney A, Barcroft LC, Natale D, Urquhart J, Weasthusin ME. 2000. Impact of bovine oocyte maturation media on oocytes transcript levels, blastocyst development, cell number and apoptosis. *Biol Reprod* 62 : 355-364
- Widjiati. 2007. Induksi maturasi oosit secara *in vitro* oleh TGF β asal oosit kumulus kompleks. [Disertasi]. Universitas Brawijaya. Malang.
- Yang P, Roy SK. 2001. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro*. *Biol Reprod* 65 : 847 - 854