

Pengaruh Penambahan *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) dalam Sel Granulosa terhadap Konsentrasi Progesteron pada Tingkat Maturasi Oosit

In Vitro Effect of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) in Granulosa Cells on Progesterone Concentration and Rate of In Vitro Maturation of Oocytes

D. Dianti¹, Z. Udin², dan Jaswandi²

¹Fakultas Pertanian Universitas Islam Indragiri Tembilahan, Riau
Jl. Kihajar Dewantara No. 1 Tembilahan 324918

²Laboratorium Reproduksi Ternak Fak. Peternakan Universitas Andalas
Kampus Unand Limau Manis Padang 25163

Email: devi.dianti@yahoo.com

(Diterima: 21 November 2010; Disetujui: 28 Januari 2011)

ABSTRACT

This research was conducted to determine the effect of adding hormone FSH and PMSG in vitro oocyte maturation medium on maturation rate and hormone progesterone. In this experiment, oocytes derived from ovaries of slaughtered cattle at the slaughterhouse. Maturation medium using TCM-199 supplemented serum 10%, gentamicin 50 ug/ml, FSH 10 g/ml or PMSG 10 g/ml and the culture of granulosa cells 1x10⁵ cells/ml. In each treatment unit is used 20 oocyte quality A and B in 100 mL of maturation medium. Randomized Blok Design in factorial (2x2x4) was used in this experiment. The Factor A culture (without cells and granulosa cells), B factor hormones (PMSG and FSH). Variables measured were the number maturation and progesterone hormone levels in maturation medium by using RIA techniques. The results shown, there is no interaction of hormone addition in granulosa cell numbers on maturation level and progesterone concentration in maturation medium. Granulosa cell in maturation medium significantly (P<0.05) increased the number of oocyte maturation in vitro. The highest maturation was obtained from media with granulosa cells and FSH of 71.25%, while the highest progesterone obtained from media with granulosa cells and PMSG 1.40 ng/ml.

Keywords: *Oocyte, FSH, PMSG, progesteron*

PENDAHULUAN

Penerapan bioteknologi merupakan upaya untuk meningkatkan efisiensi reproduksi ternak, terutama untuk mendapatkan ternak dengan kualitas dan kuantitas yang baik. Transfer embrio adalah salah satu cara yang dipandang efisien dan efektif dalam bidang reproduksi, namun produksi embrio secara *in vivo* terbatas oleh kemampuan ternak betina donor untuk menghasilkan embrio. Produksi embrio secara *in vitro* melalui teknik *in vitro* Fertilisasi (IVF) merupakan suatu alternatif untuk menyelesaikan permasalahan tersebut. Teknik IVF dapat memanfaatkan limbah oosit di Rumah Potong Hewan (RPH). Pemanfaatan oosit dari hewan yang dipotong merupakan cara produksi embrio yang ekonomis karena dengan cara ini oosit hewan yang harusnya dibuang dapat dimanfaatkan untuk dijadikan bakal bibit.

Teknologi IVF merupakan teknologi untuk produksi embrio pada lingkungan buatan (luar tubuh). Teknologi ini terdiri atas serangkaian kegiatan yang meliputi maturasi oosit, fertilisasi oosit dengan sperma dan kultur embrio. Hal yang harus dilakukan pada

teknik IVF adalah menciptakan lingkungan *in vitro* yang menyerupai lingkungan asalnya di dalam tubuh (*in vivo*).

Keadaan tersebut dapat diciptakan dengan menambahkan hormon ke dalam medium pematangan maupun medium kultur. Hormon yang umum digunakan adalah *Follicle Stimulating Hormon* (FSH), akan tetapi hormon ini relatif mahal. Hormon lain yang mempunyai kerja yang sama dengan FSH adalah *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG). Secara fisiologis PMSG lebih bersifat seperti FSH, PMSG memiliki fungsi merangsang pembentukan dan pertumbuhan *follicle* sehingga meningkatkan kadar hormon estrogen dalam darah (disekresikan oleh *follicle de Graaf*). Disamping itu PMSG juga memiliki fungsi mirip LH yang mampu menstimulasi pertumbuhan sel-sel interstisial ovarium yang merangsang terjadinya ovulasi dan terbentuknya sel-sel luteal (Partodihardjo, 1987).

Tahapan maturasi dalam teknik IVF membutuhkan media kultur, dan yang sering digunakan adalah *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199). Media kultur dapat disuplementasi

dengan monolayer sel granulosa yang berasal dari sisa *slicing ovarium* (Gordon, 1994). Dalam penelitian Jaswandi *et al.*, (2003) diketahui bahwa dalam media yang secara kebetulan terdapat sel granulosa, terlihat perkembangan embrio yang lebih baik dari segi kualitas dan kuantitas sampai tahap morula, tetapi sebagian gagal berkembang ke tahap berikutnya. Sel granulosa secara *in vivo* terdapat pada folikel yang aktif untuk menghasilkan hormon steroid, di antaranya adalah hormon estrogen. Estrogen terbentuk dari prekursor *cholesterol*, proses sintesanya melewati beberapa tahap yang membutuhkan hormon perantara termasuk di dalamnya hormon progesteron.

Hewan-hewan betina sejak lahir pada ovariumnya sudah dilengkapi oleh ratusan ribu *follicle*, namun selama hidupnya hanya sebagian kecil saja yang berhasil diovulasikan. Upaya untuk memaksimalkan fungsi sel granulosa sebagai sumber daya biologik hormon endogen perlu sentuhan teknologi. Melihat Bertolak dari kondisi tersebut perlu adanya kajian untuk memodifikasi teknik kultur dengan menambahkan sel granulosa ke dalam media maturasi. Penambahan sel granulosa ini yang diharapkan dapat menyediakan zat atau faktor penumbuh bagi embrio. Faktor tersebut dapat berupa kandungan hormon progesteron yang berperan dalam menstimulir diferensiasi jaringan.

Menurut Setiadi *et al.*, (2002) penambahan hormon FSH secara bersama-sama dengan sel-sel *follicle* yang di dalamnya terkandung sel granulosa dilaporkan dapat mendorong ekspansi sel-sel kumulus. Kondisi sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit menjadi penentu kualitas dari oosit tersebut. Oosit yang dikelilingi oleh sel kumulus yang sehat selanjutnya dapat berkembang menjadi M-I dan M-II dalam medium pematangan oosit *in vitro* (Hunter, 1995). Pada stadium metafase II (M-II), terlihat adanya benda kutub (PB-I), menandakan oosit telah matang, berlangsung selama 18,0 – 24,0 jam (Lanzerdorf *et al.*, 1990). Pengaruh positif yang diberikan sel granulosa dan hormon dalam maturasi oosit memungkinkan terjadinya interaksi dalam meningkatkan angka pematangan maupun kadar hormon progesteron dalam medium maturasi tersebut.

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini dilakukan penambahan hormon FSH dan PMSG dengan kultur sel granulosa ke dalam medium maturasi oosit *in vitro*, guna mengetahui pengaruh interaksi penambahan hormon FSH dan PMSG dengan kultur sel granulosa serta kadar

hormon yang dihasilkan pada medium maturasi oosit *in vitro* tersebut.

MATERI DAN METODE

Ovarium sebagai sumber oosit diperoleh dari RPH dibawa ke laboratorium dengan termos yang berisi media NaCl fisiologis (0,9%) pada temperatur 30 – 35°C.

Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara *slicing* dalam petridis yang berisi medium PBS yang disuplementasi dengan serum sapi 10% dan gentamisin 50 µg/ml dan oosit yang terlepas diamati di bawah mikroskop. Koleksi oosit dari ovarium dilakukan dengan cara penyayatan (*slicing*) untuk menghasilkan persentase oosit dengan kumulus yang kompak lebih tinggi dibanding dengan cara aspirasi (Pawshé *et al.*, 1994). Kisaran ukuran *follicle* yang digunakan sebagai sumber oosit untuk pematangan *in vitro* adalah 2 – 6 mm (Smedt *et al.*, 1992). Oosit yang digunakan dalam pematangan adalah oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus kompak dan mempunyai sitoplasma yang homogen (kualitas A dan B), dilakukan menurut prosedur yang dikemukakan oleh Jaswandi *et al.* (2003). Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang.

Penyiapan sel granulosa untuk kultur

Sel granulosa diperoleh dari sisa *slicing ovarium* untuk koleksi oosit. Sel *didistriped* dalam medium D-PBS yang mengandung tripsin 0,25%. sel dihomogenisasi dengan *magnetic strirrer*, lalu disentrifugasi 2 kali. Endapan yang diperoleh diencerkan dengan medium TCM-199 sampai konsentrasi 1×10^5 sel/ml. Selanjutnya dikultur untuk mendapatkan monolayer sel granulosa pada dasar petridis.

Maturasi oosit *in vitro*

Dalam tahap maturasi dilakukan pengujian terhadap pengaruh medium kultur sel granulosa yang diberi FSH dan PMSG terhadap tingkat maturasi oosit. Prosedur maturasi oosit *in vitro* dilakukan menurut prosedur yang dikemukakan oleh Jaswandi *et al.* (2003). Oosit yang diperoleh dicuci 3 kali dalam medium PBS dan dilanjutkan dalam medium maturasi. Medium maturasi oosit yang digunakan yaitu medium TCM-199 yang disuplementasi dengan FSH 10 µg/ml atau PMSG

10 µg/ml, serum sapi 10% dan gentamisin 50 µg/ml serta ditambahkan sel granulosa. Oosit yang telah dicuci dalam medium TCM-199 dimasukkan ke dalam 200 µl mikrodrip medium yang dibuat pada sebuah petridis, kemudian ditutupi dengan mineral oil. Penggunaan medium yang ditutup dengan minyak mineral memberikan beberapa keuntungan seperti mencegah atau mengurangi penguapan air, mencegah kontaminasi mikroba, mengurangi fluktuasi suhu dan memudahkan selama pengamatan (Gordon, 1994).

Oosit ditempatkan secara acak pada 2 medium perlakuan kultur tanpa sel granulosa dan kokultur sel granulosa serta 2 macam hormon PMSG dan FSH. Masing-masing perlakuan terdiri dari 4 ulangan dan setiap unit ulangan atau eksperimen terdiri dari 20 oosit. Oosit semua perlakuan dikultur atau diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38,5°C dalam inkubator dengan CO₂ 5%. Medium kultur adalah TCM-199 yang disuplementasi dengan serum sapi 10%, Insulin 5 µg/ml dan gentamisin 50 µg/ml. Setelah proses inkubasi media maturasi yang digunakan dimasukkan ke dalam botol untuk dianalisis kandungan hormon progesteron dengan metode RIA.

Peubah yang diamati adalah (a) angka maturasi, yaitu jumlah oosit yang telah matang yang dicirikan oleh telah terlihatnya polar body dan kromatin metafase II (b) Kadar hormon progesteron dalam medium maturasi oosit *in vitro*. Analisis data dilakukan analisis ragam dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial 2 x 2 dengan 4 ulangan sebagai kelompok. Faktor A adalah dua macam kultur, yaitu kultur tanpa sel granulosa (A₁) dan kokultur sel granulosa (A₂). Faktor B adalah dua macam hormon, yaitu FSH

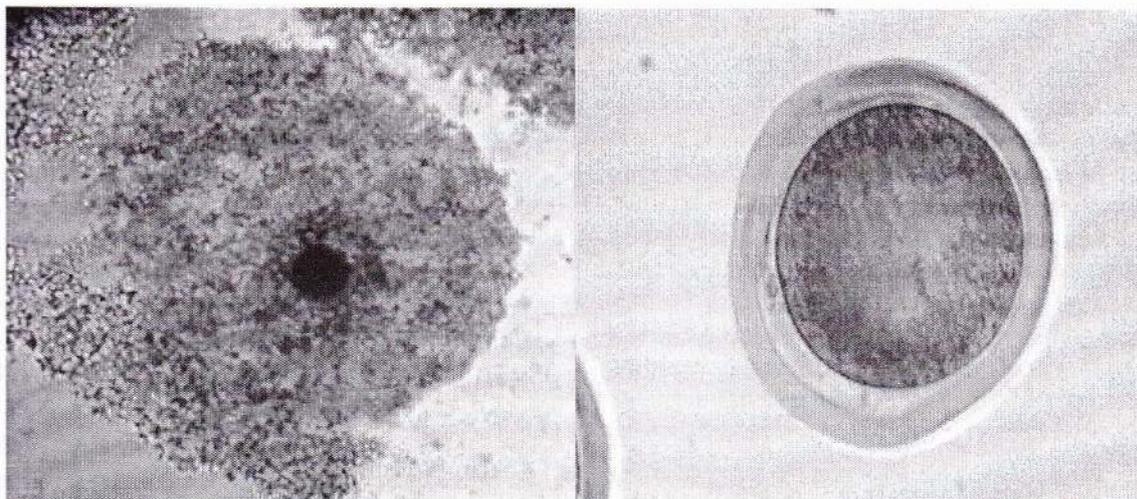
(B₁) dan PMSG (B₂). Jika terdapat pengaruh yang nyata, maka analisis dilanjutkan dengan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) (Steel dan Torrie, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Persentase maturasi oosit secara *in vitro*

Persentase maturasi didapat dari jumlah oosit yang telah terlihat polar body dan kromatin metafase II, dibandingkan dengan jumlah oosit yang dimaturasi. Hasil penelitian yang dilakukan didapat oosit yang telah mencapai tahap metafase II atau telah memiliki polar body dapat dilihat pada Gambar 1 dan angka persentase oosit yang telah matang dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil analisis statistik tidak terdapat interaksi antara faktor penambahan kultur sel granulosa dengan faktor penambahan hormon dalam medium maturasi oosit terhadap angka maturasi oosit *in vitro*.

Hal tersebut menunjukkan bahwa penggunaan hormon FSH dan PMSG sama efektifnya dalam mendorong perkembangan pematangan oosit. Hasil penelitian menunjukkan terjadinya peningkatan persentase maturasi oosit yang dikultur dengan sel granulosa. Oosit yang dimatangkan dalam medium maturasi tanpa sel granulosa mencapai tingkat maturasi sebesar 53,75% – 58,75% dengan rata-rata 56,25%, sedangkan maturasi dengan kultur sel granulosa mencapai tingkat maturasi 63,75% – 71,25% dengan rata-rata 67,50%. Hasil ini menunjukkan persentase maturasi oosit lebih tinggi medium dengan sel granulosa dari pada tanpa sel granulosa. Perbedaan hasil yang diperoleh dapat disebabkan oleh metode pematangan yang digunakan.



Gambar 1. (a) Oosit yang telah dimaturasi (b) Oosit terlihat telah memiliki polar body

Tabel 1. Persentase maturasi oosit secara *in vitro* (%)

| Faktor A (Kultur) | Faktor B (Hormon) | | Rataan Kultur |
|---------------------|-------------------|---------------|---------------------------|
| | PMSG | FSH | |
| Tanpa Sel granulosa | (43/80) 53,75 | (47/80) 58,75 | 56,25 ^a ± 3,54 |
| Sel Granulosa | (51/80) 63,75 | (57/80) 71,25 | 67,50 ^b ± 5,30 |
| Rataan Hormon | 58,75 ± 7,07 | 65,00 ± 8,84 | |

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$). Tanda kurung dalam tabel (jumlah oosit yang matang/jumlah oosit yang dimatangkan)

Hasil ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Gordon (1994), bahwa faktor medium yang ditambahkan dengan sel-sel granulosa, yang dapat meningkatkan angka maturasi oosit. Hasil penelitian ini lebih tinggi dari hasil yang didapatkan oleh Hendri (1999) dengan angka kematangan oosit sebesar 60%.

Hasil analisis statistik faktor A (kultur) terhadap angka pengamatan menunjukkan bahwa perlakuan medium tanpa sel granulosa berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap medium yang memakai kultur sel granulosa. Hal ini berarti pemakaian kultur sel granulosa dalam medium maturasi oosit dapat meningkatkan persentase oosit yang matang. Sesuai dengan hasil penelitian yang dikemukakan Jaswandi *et al.*, (2003) bahwa medium yang di dalamnya terkandung sel granulosa yang merupakan bagian dari *follicle*, terlihat perkembangan embrio yang lebih baik dari segi kualitas dan kuantitas. Demikian juga dari hasil penelitian Teotia (2001) yang mendapatkan sel granulosa dari folikel mendukung proses maturasi sitoplasma oosit kambing sebagaimana yang terlihat dari maturasi yang lebih baik, tingginya angka fertilisasi, angka *cleavage* meningkat dan pembentukan morula yang lebih baik.

Pemakaian hormon PMSG dan FSH dalam medium maturasi oosit *in vitro* tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$), namun terlihat peningkatan persentase maturasi oosit yang lebih tinggi pada pemakaian FSH. Dimana angka maturasi yang didapat pada pemakaian PMSG sebesar 53,75% – 63,75% dengan rata-rata 58,75%. Sedangkan pada pemakaian FSH didapat angka maturasi sebesar 58,75% – 71,25% dengan rata-rata 65,00%.

Tingkat kematangan inti yang hampir sama di antara kedua perlakuan hormonal menunjukkan aktifitas biologis yang hampir sama dari hormon

PMSG dan FSH dalam menstimulasi pertumbuhan folikel dan pematangan inti oosit sampai tahap metafase II. Seperti yang dikemukakan oleh Cole and Cupps (1997) dalam Partodihardjo (1987), bahwa secara fisiologis PMSG lebih bersifat FSH yang memiliki fungsi merangsang pembentukan dan pertumbuhan *follicle* sehingga meningkatkan kadar hormon estrogen di dalam darah (disekresikan oleh *follicle de Graaf*). Sedangkan PMSG yang mirip dengan LH, mampu menstimulasi pertumbuhan sel-sel interstisial ovarium yang merangsang terjadinya ovulasi dan merangsang terbentuknya sel-sel luteal. PMSG dalam dosis yang rendah akan memperlihatkan pengaruh yang mirip seperti FSH, jika dosisnya ditingkatkan maka pengaruhnya yang mirip LH akan terlihat (Nalbandov and Casida, 1940). Hasil ini juga diperkuat oleh Gupta *et al.*, (2004) bahwa PMSG efektif untuk menggantikan peranan FSH untuk maturasi *in vitro*.

Tingkat kematangan yang sedikit rendah pada pemakaian PMSG dibanding FSH pada penelitian ini kemungkinan disebabkan oleh dosis yang belum optimal dari PMSG. Hasil penelitian Gupta *et al.*, (2004) pada kerbau menunjukkan bahwa hasil terbaik dari penggunaan PMSG dalam medium pematangan oosit kerbau secara *in vitro* adalah dengan dosis 40 – 50 IU/ml, sedangkan pada penelitian Jaswandi, *et al.* (2003) penggunaan hormon dengan dosis 10 µg/ml.

Kadar hormon progesteron dalam medium maturasi oosit secara *in vitro*

Kadar hormon progesteron yang didapat dari medium maturasi oosit yang dikultur dengan sel granulosa yang ditambahkan hormon PMSG dan FSH secara *in vitro*. Hasil dari penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Kadar hormon progesteron pada maturasi oosit secara *in vitro* (ng/ml)

| Faktor A (Kultur) | Faktor B (Hormon) | | Rataan Kultur |
|---------------------|-------------------|-------------|---------------|
| | PMSG | FSH | |
| Tanpa Sel granulosa | 0,74 | 0,71 | 0,72 ± 0,02 |
| Sel Granulosa | 1,40 | 0,70 | 1,05 ± 0,49 |
| Rataan Hormon | 1,07 ± 0,47 | 0,70 ± 0,01 | |

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$).
Tanda kurung dalam tabel (jumlah oosit yang matang/jumlah oosit yang dimatangkan)

Hasil penelitian dan uji statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat interaksi dari penambahan sel granulosa dengan hormon FSH dan PMSG dalam medium maturasi oosit terhadap kadar hormon progesteron.

Hal ini kemungkinan disebabkan karena kinerja sel tidak saling berkaitan dengan kinerja hormon FSH dan PMSG. Namun terdapat sel lain seperti sel kumulus dalam penelitian Shirazi and Moalenian (2007) yang menunjukkan bahwa sel kumulus dalam maturasi *in vitro* berperan terhadap produksi hormon steroid dalam maturasi oosit *in vitro*.

Hasil penelitian menunjukkan produksi hormon progesteron paling tinggi terdapat pada medium maturasi oosit yang menggunakan hormon PMSG, yaitu sebesar 0,74 – 1,40 ng/ml. Sedangkan medium yang menggunakan hormon FSH sebesar 0,71 – 0,70 ng/ml. Hal ini menunjukkan bahwa peranan hormon PMSG dalam medium maturasi hampir setara dengan FSH. Seperti yang dikemukakan oleh Nalbandov and Casida (1940) bahwa, PMSG dalam dosis yang rendah akan memperlihatkan pengaruh yang mirip seperti FSH, jika dosisnya ditingkatkan maka pengaruhnya yang mirip LH akan terlihat. Sebelumnya juga telah dikemukakan oleh Cole and Cupps (1969) dalam Partodihardjo (1987), bahwa secara fisiologis PMSG lebih bersifat FSH yang memiliki fungsi merangsang pembentukan dan pertumbuhan folikel sehingga meningkatkan kadar hormon di dalam darah (disekresikan oleh *folikel de graaf*) Ditambahkan oleh Nalbandov (1990) bahwa dua komponen yang terdapat pada ovarium adalah dan CL yang keduanya mengeluarkan hormon progesteron (*in vivo*).

Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang tidak nyata ($P > 0,05$) pada tiap perlakuan. Hal ini berarti penambahan FSH dan PMSG dalam maturasi oosit dengan sistem kultur tanpa sel atau kokultur sel granulosa tidak memberikan pengaruh terhadap kadar hormon progesteron dalam medium maturasi oosit *in vitro*.

Rata-rata kadar hormon progesteron tertinggi dalam penelitian ini didapat dari medium yang menggunakan kultur sel granulosa dengan hormon PMSG, yaitu sebesar 1,40 ng/ml. Hal ini disebabkan PMSG dibentuk pada jaringan plasenta, dan telah banyak bukti plasenta memproduksi hormon progesteron (Partodihardjo, 1987).

KESIMPULAN

1. Tidak terdapat interaksi penambahan sel granulosa dengan PMSG dan FSH dalam medium maturasi terhadap angka maturasi oosit dan kadar hormon progesteron.
2. Persentase maturasi oosit yang tertinggi didapatkan pada medium dengan sel granulosa.
3. Penambahan sel granulosa dan suple-mentasi hormon (PMSG atau FSH) kedalam media *in vitro* TCM 199 tidak berefek pada kadar hormon progesteron

DAFTAR PUSTAKA

- De Smedt, V., N. Crozet., M. Ahmed Ali., A. Martino, and Y. Cognie. 1992. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*. 37: 1049-1060.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. Biotechnology in Agricultural Series. CAB. International.
- Gupta, P.S.P., S. Nandi., B.M. Ravindranatha, and P.V. Sarma. 2004. Effect of commercially available PMSG on maturation, fertilization and embryo development of buffalo oocytes *in vitro*. *Tech. Report. Reprod, fert and Dev*. 13: 355-360.
- Haney, A.F. and D.W. Schomberg. 1981. Estrogen and progesterone production by developing porcine follicles *in vitro* evidence for estrogen formation by theca. *The Endocrine Society. Endocrinology*. 109: 971-977.

- Hendri. 1999. Penambahan berbagai Jenis Serum pada Medium TCM-199 untuk Produksi Embrio Sapi melalui Teknik Fertilisasi *In Vitro*. Laporan Penelitian Dosen Muda. Fakultas Peternakan Universitas Andalas. Padang.
- Hunter, R.H.F. 1995. Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik (Terjemahan D.K.H. Putra). ITB. Bandung.
- Jaswandi., Z. Udin, dan M. Mundana. 2003. Pengembangan Sistem Kultur Tanpa CO₂ dalam Produksi Embrio Secara *In Vitro*. Laporan hibah Bersaing XI.
- Lanzerdorf, S.E., P.M. Gliesman, A.E. Archibong, M. Alexander, and D.P. Wolf. 1990. Collection and quality of rhesus monkey semen molecular. *Reprod and Dev.* 25:61-66.
- Moor, R.M. 1977. Sites of steroid production in ovine graafian follicles in culture. *Endocrinology* 73:143-150.
- Nalbandov, A.V. and L.E. Casida. 1940. Gonadotrophic action of pituitaries from pregnant cows. *Endocrinol.* 25: 559-566.
- Nalbandov, A.V. 1990. Fisiologi Reproduksi pada Mamalia dan Unggas. Edisi ke-3. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Partodihardjo, S. 1987. Ilmu Reproduksi Hewan. Cetakan ke-3. Mutiara Sumber Widya. Jakarta.
- Pawshhe, C.H., S.M. Totey, and S. K. Jain. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat for in vitro maturation and fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology* 25: 591-600.
- Setiadi, M.A. 2002. Effect of coculturing with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine in vitro. *Reprotech.* 1:87-91.
- Shirazi, A. and Z. Moalemian. 2007. Ovine cumulus cells estradiol 17 β Production in the presence or absence of oocytes. *Animal Reproduction science.* 101: 125-133.
- Steel, R.D.G. and J.H. Torrie. 1995. Prinsip dan Prosedur Statistik Suatu Pendekatan Biometrik. Gramedia. Jakarta.
- Teotia, A.T., G. Tarusharma, and A.C. Majumdan. 2001. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayer. *Theriogenology* 40:165-177.