

Penelitian

## Kualitas Oosit Domba dari Ovarium setelah Penyimpanan pada Suhu dan Periode Waktu yang Berbeda

(Characteristic of Sheep Oocytes from the Ovary after Storage in Different Temperature and Period)

Dhia Mardhia Engcong, Ni Wayan Kurniani Karja\*

Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor, 16680 Indonesia

\*Penulis untuk korespondensi: karja\_nwk@yahoo.com

Diterima 31 Oktober 2012, Disetujui 7 Februari 2013

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik oosit domba dari ovarium yang disimpan pada suhu dan periode penyimpanan yang berbeda. Ovarium dari rumah potong hewan dibagi menjadi tiga kelompok. Ovarium disimpan dalam larutan NaCl 0,9 % pada suhu 4, 27-28, dan 37-38 °C selama 2, 5-7, dan 8-10 jam untuk masing-masing suhu penyimpanan. Pada setiap akhir periode penyimpanan, oosit dikoleksi dari ovarium dengan menggunakan metode penyayatan. Oosit kemudian diseleksi dan dibagi menjadi 4 (empat) kelompok yaitu kelompok A, B, C, dan D berdasarkan lapisan sel kumulus dan gambaran sitoplasmanya. Oosit dengan kualitas A yang dikoleksi dari ovarium 2 jam dan 5-7 jam ( $P > 0,05$ ) tidak berbeda, tetapi kemudian menurun setelah penyimpanan 8-10 jam ( $P < 0,05$ ). Oosit dengan kualitas B yang dikoleksi 5-7 jam setelah penyimpanan lebih tinggi dari pada kelompok 2 dan 8-10 jam ( $P < 0,05$ ). Tidak ditemukan adanya perbedaan jumlah oosit dengan kualitas C yang diperoleh pada penelitian ini. Sedangkan jumlah oosit dengan kualitas D meningkat seiring dengan lamanya waktu penyimpanan ovarium pada suhu 37-38 °C ( $P < 0,05$ ). Berdasarkan dari data tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa kualitas oosit menurun seiring dengan periode penyimpanan ovarium. Penurunannya terlihat secara nyata setelah 8-10 jam dari periode penyimpanan ovarium kecuali pada kelompok 4 °C.

**Kata kunci:** oosit, domba, penyimpanan ovarium, suhu

### ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the characteristic of sheep oocytes from the ovaries that was stored at different temperature and period. The ovaries were stored at 4 °C for the period of 2, 5-7 and 8-10 h; 27-28 °C for 2, 5-7 and 8-10 h; and the third group was stored at 37-38 °C for 2, 5-7 and 8-10 h. At the end of the storage period, the oocytes were collected from the ovaries using the slicing method. Collected oocytes were graded as A, B, C and D based on the layers of the cumulus cell and images of the cytoplasm. The A quality of oocytes collected at 2 h after storage was significantly higher than those of oocytes from ovary storage for 8-10 h. On the other hand the B quality of oocytes collected at 5-7 h was higher than other groups ( $P < 0.05$ ). These result suggested that quality of oocytes decrease as long as storing of ovaries, except for 4 °C group.

**Key words:** oocytes, sheep, ovary storage, temperature

### PENDAHULUAN

Keberhasilan dari teknologi *in vitro fertilization* (IVF) sangat dipengaruhi oleh kualitas oosit dan sel spermatozoa yang digunakan. Kualitas oosit sangat dipengaruhi oleh penanganan ovarium se-

jak dikeluarkan dari tubuh hewan, selama proses transportasi ke laboratorium dan saat dikoleksi hingga mengalami proses maturasi (Choi et al., 2004). Ovarium yang dikeluarkan dari tubuh hewan, umumnya tidak lagi mendapatkan suplai darah yang menyebabkan oosit mengalami is-

kemia (Wang *et al.*, 2011). Kondisi iskemia dapat menyebabkan perubahan pada folikel karena berkurangnya oksigen, akumulasi hasil metabolisme, berkurangnya glukosa, dan meningkatnya indeks apoptosis pada sel granulosa (Pedersen *et al.*, 2004). Selain itu, Schatten & Gheorghe (2007) menyatakan bahwa oosit primer lebih sensitif terhadap lingkungan, sehingga metode penanganan ovarium selama transportasi penting untuk dioptimalkan agar dapat menjaga kondisi oosit tetap baik. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengetahui kondisi optimum media transportasi agar kualitas oosit tetap dapat dipertahankan untuk mendukung keberhasilan *in vitro maturation* (IVM), *in vitro fertilization* dan *in vitro culture* (IVC). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik oosit domba dari ovarium yang disimpan pada suhu dan periode penyimpanan yang berbeda sehingga didapatkan suatu metode penyimpanan ovarium selama transportasi yang mampu mempertahankan kualitas oosit domba.

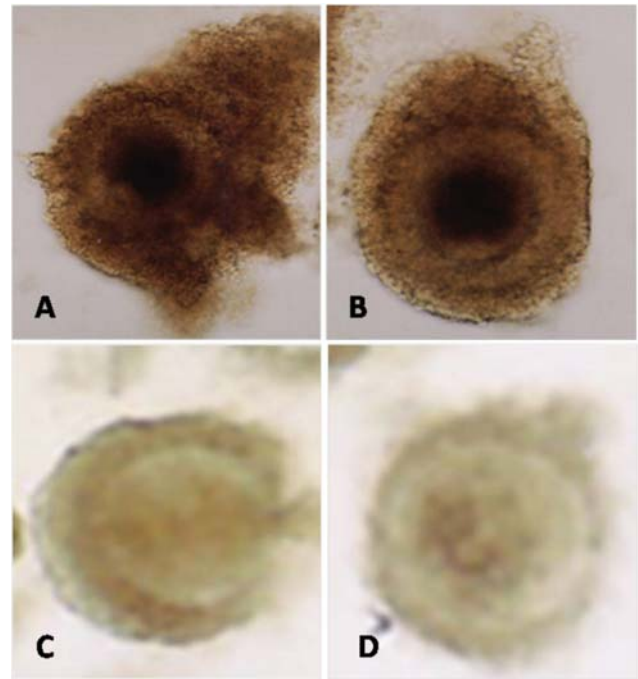
## BAHAN DAN METODE

### Koleksi Ovarium

Ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan dibagi menjadi tiga kelompok untuk disimpan pada suhu dan periode waktu yang berbeda. Ovarium disimpan dalam larutan NaCl 0,9% pada suhu 4, 27-28, dan 37-38 °C selama 2, 5-7, dan 8-10 jam untuk masing-masing suhu penyimpanan.

### Koleksi Oosit

Pada setiap akhir periode penyimpanan ovarium, oosit dikoleksi dari ovarium dengan menggunakan metode penyayatan dalam phosphate buffered saline (PBS). Oosit yang telah dikoleksi, kemudian diseleksi menjadi 4 (empat) kelompok yaitu kelompok A, B, C, dan D berdasarkan lapisan sel kumulus dan gambaran sitoplasmanya (Wood & Wildt, 1997; Gordon, 2003). Oosit dikelompokkan ke dalam kelompok A jika dilapisi oleh lebih dari lima lapis sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam. Kelompok B adalah oosit yang dikelilingi oleh kurang dari lima lapis sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam. Kelompok C adalah oosit mempunyai sedikit kumulus dengan sitoplasma yang sudah tidak homogen. Kelompok D adalah oosit yang mempunyai sitoplasma transparan, zona pelusida terlihat di-



Gambar 1 Pengelompokan oosit berdasarkan kualitas: A) oosit yang dilapisi oleh lebih dari lima lapis sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam. B) oosit yang dikelilingi oleh kurang dari lima lapis sel kumulus dengan sitoplasma yang homogen dan berwarna hitam. C) oosit masih terlihat sedikit kumulus, zona pelusida masih terlihat dan sitoplasma yang sudah tidak homogen. D) oosit yang mempunyai sitoplasma transparan, zona pelusida terlihat sebagian atau tidak ada, dan lapis sel kumulus hampir hilang atau hilang seluruhnya (Gordon, 2003).

lapisi oleh separuh atau tidak ada, dan lapis sel kumulus hampir hilang atau hilang seluruhnya.

### Analisis Data

Pengulangan dilakukan sebanyak 5 kali. Oosit yang telah dikelompokkan dihitung nilai rata-rata dan persentase kemudian dianalisis menggunakan ANOVA dua arah.

## HASIL

Data pada Tabel 1 merupakan hasil yang diperoleh dari ovarium yang dibawa ke laboratorium pada suhu 4 °C dengan waktu penyimpanan yang berbeda. Persentase oosit yang diperoleh berdasarkan lapisan sel kumulus dan gambaran sitoplasmanya (kualitas A, B, C, dan D, Gambar 1) tidak

berbeda diantara kelompok penyimpanan ovarium ( $P>0,05$ ).

Data pada Tabel 1 merupakan hasil yang diperoleh dari ovarium yang dibawa ke laboratorium pada suhu 4 °C dengan waktu penyimpanan yang berbeda. Persentase oosit yang diperoleh berdasarkan lapisan sel kumulus dan gambaran sitoplasmanya (kualitas A, B, C, dan D, Gambar 1) tidak berbeda diantara kelompok penyimpanan ovarium ( $P>0,05$ ).

Tabel 2 menyajikan oosit yang diperoleh dari ovarium yang dibawa atau disimpan pada suhu 27-28 °C dari rumah potong hewan sampai oosit dikoleksi. Dari kelompok perlakuan ini, diperoleh oosit dari ovarium yang disimpan selama 2 jam dengan kualitas A lebih tinggi daripada oosit yang diperoleh dari ovarium yang disimpan pada suhu yang sama selama 5-7 dan 8-10 jam ( $P<0,05$ ). Oosit dengan kualitas B, C, dan D yang diperoleh tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan ( $P>0,05$ ).

Tabel 3 menyajikan oosit yang diperoleh dari ovarium yang ditransport atau disimpan pada suhu 37-38 °C dengan waktu yang berbeda. Berdasarkan kualitas oosit yang diperoleh, oosit dengan kualitas A yang dikoleksi dari ovarium 2 jam dan 5-7 jam penyimpanan ovarium ( $P>0,05$ ) tidak berbeda, tetapi kemudian terjadi penurunan

jumlah oosit dengan kualitas A yang diperoleh setelah penyimpanan 8-10 jam ( $P<0,05$ ). Oosit dengan kualitas B yang dikoleksi 5-7 jam setelah penyimpanan lebih tinggi dari pada kelompok 2 dan 8-10 jam ( $P<0,05$ ). Tidak ditemukan adanya perbedaan jumlah oosit dengan kualitas C yang diperoleh pada penelitian ini. Sedangkan jumlah oosit dengan kualitas D meningkat seiring dengan lamanya waktu penyimpanan ovarium pada suhu 37-38 °C ( $P<0,05$ ).

Gambar 2 menyajikan persentase jumlah oosit dengan kualitas A dan B yang merupakan oosit yang sering dipakai untuk proses produksi embrio in vitro (Gordon, 2003). Dari data ini diperoleh bahwa jumlah oosit dengan kualitas A dan B tidak berbeda diantara kelompok perlakuan kecuali pada kelompok ovarium yang disimpan pada suhu 37-38 °C selama 5-7 jam berbeda nyata dengan kelompok ovarium yang disimpan pada suhu 37-38 °C selama 8-10 jam.

## PEMBAHASAN

Transportasi ovarium dari rumah potong hewan atau dari tempat dimana hewan tersebut mati tanpa suplai darah dapat menyebabkan penurunan kualitas oosit (Wongsrikeao *et al.*, 2005). Berhenti-nya suplai darah pada ovarium menyebabkan ter-

Tabel 1 Kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium domba setelah disimpan pada suhu 4 °C dengan periode waktu yang berbeda.

Kelompok	Jumlah Oosit	Kualitas Oosit (% ± SD)			
		A	B	C	D
2 jam	242	45 (18,6 ± 5,3)	70 (28,9 ± 7,6)	95 (39,3 ± 9,9)	32 (13,2 ± 11,1)
5-7 jam	293	56 (19,1 ± 13,1)	85 (29,0 ± 9,8)	100 (34,1 ± 13,6)	52 (17,8 ± 11,7)
8-10 jam	291	36 (12,4 ± 14,1)	85 (29,2 ± 8,9)	108 (37,1 ± 9,5)	62 (21,3 ± 11,7)

A, B, C, dan D adalah pengelompokan oosit berdasarkan Gordon (2003).

Tabel 2 Kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium domba setelah disimpan pada suhu 27-28 °C dengan periode waktu yang berbeda.

Kelompok	Jumlah Oosit	Jumlah Oosit dengan Kualitas (% ± SD)			
		A	B	C	D
2 jam	180	45 (25,0 ± 1,8) <sup>a</sup>	52 (28,9 ± 7,4)	47 (26,1 ± 10,9)	35 (19,4 ± 4,7)
5-7 jam	206	35 (17,0 ± 3,5) <sup>b</sup>	35 (34,5 ± 13,1)	69 (33,5 ± 6,4)	31 (15,1 ± 11,3)
8-10 jam	263	36 (13,7 ± 8,2) <sup>b</sup>	36 (29,3 ± 9,0)	86 (32,7 ± 14,1)	64 (24,3 ± 13,7)

A, B, C, dan D adalah pengelompokan oosit berdasarkan Gordon (2003).

a,b Nilai yang mempunyai perbedaan yang signifikan dalam satu kolom yang sama ( $P<0,05$ )

Tabel 3 Kualitas oosit yang diperoleh dari ovarium domba setelah disimpan pada suhu 37-38 °C dengan periode waktu yang berbeda.

Kelompok	Jumlah Oosit	Jumlah Oosit dengan Kualitas (% ± SD)			
		A	B	C	D
2 jam	180	58 (27,6 ± 1,7) <sup>a</sup>	58 (27,6 ± 4,5) <sup>a</sup>	60 (28,6 ± 3,8)	34 (16,2 ± 4,0) <sup>a</sup>
5-7 jam	206	48 (22,5 ± 8,8) <sup>a</sup>	75 (35,2 ± 2,1) <sup>b</sup>	68 (31,9 ± 13,8)	22 (10,3 ± 7,8) <sup>a</sup>
8-10 jam	263	39 (13,4 ± 6,0) <sup>b</sup>	73 (25,0 ± 4,1) <sup>a</sup>	105 (36,0 ± 12,6)	75 (25,7 ± 6,5) <sup>b</sup>

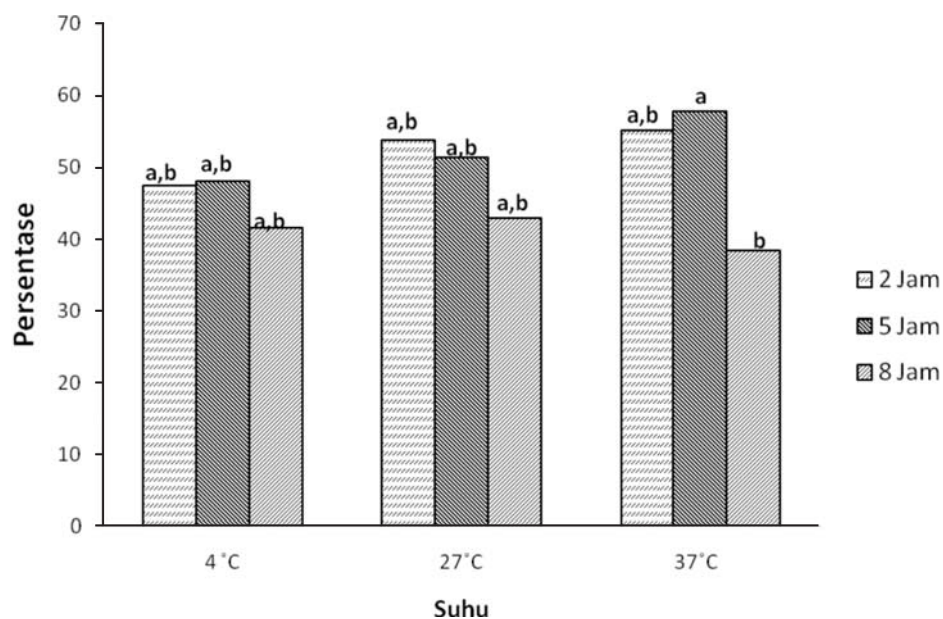
A, B, C, dan D adalah pengelompokan oosit berdasarkan Gordon (2003).

a,b Nilai yang mempunyai perbedaan yang signifikan dalam satu kolom yang sama ( $P < 0,05$ )

jadi perubahan metabolisme sel dari areobic menjadi anaerobic. Pada kondisi anaerob, metabolisme sel-sel ovarium akan menghasilkan asam laktat dan asam fosfat yang banyak. Akumulasi asam laktat dan asam fosfat akan meningkatkan jumlah ion H<sup>+</sup>. Ion H<sup>+</sup> ini mudah masuk ke dalam pori membran plasma oosit sehingga kondisi sitoplasma oosit lebih asam berbanding lingkungan sekitarnya. Kondisi asam ini menyebabkan kerusakan pada oosit, seperti fragmentasi pada DNA (Wongsrikeao *et al.*, 2005). Oleh karena itu, suhu dan waktu transportasi ovarium yang tepat sangat diperlukan untuk dapat mempertahankan kualitas oosit (Choi *et al.*, 2004).

Ovarium yang disimpan pada suhu dingin (4 °C) merupakan salah satu metode yang dipakai untuk memperlambat kerja metabolisme selular sehingga

akumulasi asam dapat dihambat sampai waktu tertentu (Petrucci *et al.*, 2010). Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 1, oosit dengan kualitas A, B, C, dan D tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan diantara kelompok perlakuan, yaitu penyimpanan suhu 4 °C pada suhu 2, 5-7, 8-10 jam. Pada penelitian ini, pengaruh penyimpanan pada suhu 4 °C selama 8-10 jam mungkin menyebabkan metabolisme sel-sel ovarium dan oosit dapat diturunkan sehingga menurunkan kebutuhan oksigen dan menghemat energi (Taylor, 2006). Evecen *et al.* (2009) melaporkan bahwa ovarium kucing yang disimpan selama 2 jam dan 24 jam pada suhu 4 °C tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kemampuan oosit untuk mencapai metafase II secara *in vitro*, kemampuannya baru menurun setelah disimpan selama 48 jam. Penelitian pada kuda (Love *et al.*,



Gambar 2 Persentase jumlah oosit dengan kualitas A dan B yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu dan periode waktu yang berbeda. Huruf a,b menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan sedangkan huruf a dan b menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ).

2003), anjing (Lee *et al.*, 2006) dan babi (Yuge *et al.*, 2003) menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan terhadap kemampuan oosit untuk mengalami maturasi dari oosit yang diperoleh setelah disimpan pada suhu 4 °C selama 2 hingga 24 jam. Hal ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Carvalho *et al.* (2001) dan Ozen *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa oosit domba lebih rentan terhadap suhu dingin karena membran lipid pada oosit tidak mampu bertahan pada suhu dingin. Paparan terhadap suhu dingin dapat menyebabkan hilangnya integritas dari membran oosit (Wongsrikeao *et al.*, 2005). Penyimpanan pada suhu dingin juga dapat menyebabkan terjadinya pengerasan zona pelusida sehingga mengurangi kemampuan oosit untuk difertilisasi (Parks & Ruffing, 1992).

Suhu ruang (27-28 °C) dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol dan sebagai upaya untuk mengantisipasi apabila di lapangan tidak tersedia es dan air hangat. Data pada Tabel 2 memperlihatkan perbedaan yang signifikan pada kelompok oosit dengan kualitas A dengan perbedaan waktu penyimpanan. Persentase jumlah oosit dengan kualitas A lebih tinggi pada penyimpanan 2 jam (25%) dibandingkan dengan penyimpanan 5-7 jam (17%) dan 8-10 jam (14%). Perdesen *et al.* (2004) melaporkan bahwa penyimpanan ovarium kuda pada suhu ruang selama 3 jam pertama setelah hewan disembelih belum terjadi apoptosis pada sel granulosa tetapi setelah penyimpanan 5 jam terjadi apoptosis pada sel granulosa sebesar 22% dan setelah 24 jam sebesar 78%. Begitu juga halnya pada penelitian ini, jumlah oosit dengan kualitas A yang dikoleksi berkurang dengan bertambahnya waktu penyimpanan ovarium. Penelitian pada folikel tikus juga memperlihatkan gambaran apoptosis yang terjadi secara progresif seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan. Selain peningkatan apoptosis, jumlah oosit tanpa sel kumulus juga bertambah dan kekompakan kumulus-oosit juga berkurang seiring dengan bertambahnya waktu (Perdesen *et al.*, 2004).

Penyimpanan ovarium pada suhu 37-38 °C sering digunakan karena suhu ini mendekati suhu tubuh hewan. Blondin dan Sirard (1995) melaporkan bahwa penyimpanan ovarium pada suhu 30 °C selama 3-4 jam dapat meningkatkan kompetensi perkembangan oosit untuk mencapai metafase II secara *in vitro*. Data pada penelitian ini menunjukkan bahwa oosit dengan kualitas A dan B yang dikoleksi dari ovarium yang disimpan pada suhu 27-28 °C dan 37-38 °C menunjukkan kecenderungan lebih tinggi selama 2 dan 5-7 jam penyimpanan

dibandingkan dengan penyimpanan pada suhu 4 °C. Menurut Febretrisiana (2012), lingkungan mikro yang baik pada folikel dapat dipertahankan pada 4 jam setelah pembedahan. Lingkungan mikro ini menyerupai kondisi di dalam tubuh hewan pada saat terjadi proses preovulatori folikel (sebelum terjadi proses ovulasi). Akan tetapi, penyimpanan pada suhu ini lebih dari 8 jam menyebabkan penurunan perolehan oosit dengan kualitas A dan B dan terjadi peningkatan jumlah oosit dengan kualitas D seiring dengan lama waktu penyimpanan ovarium. Setelah 4 jam, lingkungan penyimpanan oosit tidak lagi mampu mendukung kebutuhan sel-sel untuk mendapatkan nutrisi yang akan menyebabkan kondisi anaerob. Akumulasi asam dan peningkatan ion-ion akan menyebabkan perubahan pH dan osmolalitas membran seluler menjadi permeable, sehingga air masuk ke intrasel yang menyebabkan degenerasi sel-sel oosit (Carvalho *et al.*, 2001).

Berdasarkan dari data tersebut di atas dapat disimpulkan bahwa kualitas oosit menurun seiring dengan periode penyimpanan ovarium. Penurunan kualitas terlihat secara nyata setelah 8-10 jam dari periode penyimpanan ovarium, kecuali pada kelompok 4 °C dimana kualitas oosit masih tetap dapat dipertahankan.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini sebagian didanai oleh Hibah Bersaing Institut Pertanian Bogor No.15/13.24.4/SPP/PHB/2011 a.n. NWK.

*“Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan dengan pihak-pihak yang terkait dalam penelitian ini”*

## DAFTAR PUSTAKA

- Blondin P, Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocyte. *Molecular Reproduction and Development* 41: 54-62.
- Carvalho FC, Lucci CM, Silva JR, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR. 2001. Effect of Braun-Collin and saline solution at the different temperature and incubation time on the quality of goat pre-antral follicles preserved *in situ*. *Animal Reproduction Science* 66: 195-200.

- Choi YH, Roasa LM, Love CC, Brinsko SP, Hinrichs K. 2004. Blastocysts formation rates in vivo and in vitro-maturation equine oocytes fertilized intracytoplasmic sperm injection. *Biology of Reproduction* 70: 1231-1238.
- Evecen M, Cirit U, Demir K, Karaman E, Hamzaoglu AI, Bakirer G. 2009. Developmental competence of domestic cat oocyte from ovaries at various duration at 4 °C temperature. *Animal Reproduction Science* 116: 169-172.
- Febretrisiana A. 2012. Kompetisi perkembangan oosit domba dengan penyimpanan ovarium pada suhu dan waktu berbeda. Tesis S2. Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Gordon I. 2003. *Laboratory of Production Cattle Embryo*. 2nd ed. CABI Publishing. Wallingford.
- Lee HS, Yin XJ, Kong IJ. 2006. Sensitivity of canine oocytes to low temperature. *Theriogenology* 66: 1468-1470.
- Love LB, Choi YM, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. 2003. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology* 59: 756-774.
- Ozdas OB, Tas M, Umut C, Mithat E, Bacinoglu S, Kamber D, Ak K, Ileri KI. 2006. Effect of different transport temperatures of cattle and sheep ovaries on in vitro maturation of oocytes. *Medycyna Weterynaryjna* 62: 162-164.
- Pedersen HG, Watson ED, Telfer EE. 2004. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology* 62: 468-480.
- Parks JE, Ruffing NA. 1992. Factor effecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology* 37: 59-73.
- Petrucci RH, Herring FG, Madura JD. 2010. *General Chemistry Principle and Modern Application*. 10th ed. Prentice-Hall, Inc.
- Schatten H, Gheorghe M. 2007. *Comparative Reproductive Biology*. Blackwell Publishing. USA.
- Taylor MJ. 2006. *Biology of Cell Survival in the Cold: The Basis for Cryopreservation of Tissues and Organs*. CRC-Taylor & Francis. p15-62.
- Wang YS, Zhao X, Su JM, An ZX, Xiong XR, Wang LJ, Liu J, Quan FS, Hua S, Zhang Y. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science* 124: 48-54.
- Wongsrikeao P, Otoi T, Karja NW, Agung B, Nii M, Nagai T. 2005. Effect of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *Jurnal of Reproduction and Development* 51: 87-97.
- Wood TC, Wildt DE. 1997. Effect of the quality of the cumulus-oocyte complex in the domestic cat on the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into blastocysts in vitro. *Jurnal of Reproduction and Fertility* 110: 355-360.
- Yuge M, Otoi T, Nii M, Murakami M, Karja NW, Rajaei F, Agung B, Wongsrikeao P, Murakami M, Suzuki T. 2003. Effects of cooling ovaries before oocyte aspiration on meiotic competence of porcine oocytes and of exposing in vitro matured to ambient temperature on in vitro fertilization and development of oocytes. *Cryobiology* 47: 102-108.