

## TINGKAT PERKEMBANGAN AWAL EMBRIO SAPI *IN VITRO* MENGUNAKAN MEDIA TUNGGAL BERBAHAN DASAR *TISSUE CULTURE MEDIUM (TCM) 199*

### *Early Bovine Embryonic Development Rate in Vitro Using Single Medium Based on Tissue Culture Medium (TCM) 199*

Mohamad Agus Setiadi<sup>1</sup> dan Ni Wayan Kurniani Karja<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor  
E-mail: setiadi03@yahoo.com

#### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui kemampuan perkembangan awal embrio sapi *in vitro* menggunakan media tunggal untuk maturasi, fertilisasi, dan kultur berbahan dasar *tissue culture medium* (TCM) 199. Oosit sapi dikumpulkan dari rumah potong hewan dengan teknik aspirasi dan diklasifikasikan berdasarkan kekompakan sel kumulus dan sitoplasma yang homogen. Oosit dimaturation pada medium TCM 199 yang disuplementasi dengan 10 IU/ml *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG), 10 IU/ml *human chorionic gonadotropin* (hCG), dan 10% *fetal bovine serum* (FBS), dilakukan selama 24 jam pada inkubator 5% CO<sub>2</sub>, 39° C. Fertilisasi dilakukan pada dua media yang berbeda yaitu media rutin fertilisasi dan media berbahan dasar TCM 199 dengan suplemen *bovine serum albumin* (BSA) dan heparin. Setelah fertilisasi, kumulus sel dihilangkan (*denudasi*), kemudian dikultur pada media TCM 199 yang disuplementasi dengan asam amino esensial dan non-esensial serta 10% FBS selama 3 hari. Hasil penelitian menunjukkan tingkat maturasi oosit pada sistem yang digunakan mampu mendukung 81,5% oosit mencapai tahap metafase II (M-II). Tingkat pembelahan embrio lebih tinggi pada media rutin dibandingkan dengan media TCM 199 yakni masing-masing 44,4 dan 23,2%. Jumlah embrio tahap 4-8 sel pada kedua perlakuan tidak berbeda nyata. Dapat disimpulkan media tunggal berbasis TCM dapat digunakan untuk produksi embrio *in vitro*.

Kata kunci: sapi, embrio, TCM 199, *in vitro*, perkembangan

#### ABSTRACT

Research on early bovine embryonic development *in vitro* has been done. Oocytes were collected by aspiration technique from slaughter house ovarian and classified based on the number of cumulus cell layers and homogenous of cytoplasm. Maturation media consisted of tissue culture medium (TCM) 199 supplemented with 10 IU/ml *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG), 10 IU/ml *human chorionic gonadotropin* (hCG), and 10% *fetal bovine serum* (FBS). Maturation were done in 5% CO<sub>2</sub> incubator 39° C for 24 h. Fertilization was done using two different media namely routine fertilization media and media based on TCM 199 supplemented with BSA and heparin. After fertilization periode, oocytes were denuded and then cultured in TCM 199 supplemented with essential and nonessential amino acid and 10% FBS for three days. Maturation, fertilization, and culture were done in 5% CO<sub>2</sub> incubator 39° C. Results of the experment revealed that number of mature oocytes (MII) in our system reaches 81.5%. Meanwhile number of embryonic development were higher in routine media compared to media based on TCM 199 (44.4% vs 23.2%). However, there were no significant difference in the number 4-8 cells embryo in both media. It is concluded that single media based on TCM 199 could be used for *in vitro* embryo production. However further research are required on addition comppond to improve fertilization and embryonic development in the media based on TCM 199.

Key words: bovine, embryo, TCM 199, *in vitro*, development

#### PENDAHULUAN

Keberhasilan produksi embrio *in vitro* pada sapi masih mengalami fluktuasi pada setiap laboratorium di seluruh dunia. Hal ini karena jenis media, serum, serta protokol yang digunakan di setiap laboratorium masih bervariasi. Berbagai media untuk perkembangan embrio *in vitro* terus diteliti untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal. Pada umumnya proses produksi embrio dilakukan melalui tiga tahapan utama yaitu pematangan oosit (*in vitro maturation*), pembuahan oosit oleh spermatozoa (*in vitro fertilisation*), dan menumbuhkan oosit yang telah dibuahi sampai tahap perkembangan morula atau blastosis (*in vitro culture*).

Ketiga tahapan produksi embrio biasanya menggunakan media yang berbeda-beda untuk mendukung perkembangan oosit dan spermatozoa sehingga mampu berkembang mencapai tahap blastosis. Tiga media utama harus tersedia yaitu media

pematangan, media fertilisasi, serta media kultur. Penambahan beberapa komponen spesifik pada setiap media seperti hormon, makromolekul, cairan fisiologis lainnya dengan komposisi yang dianggap tidak bersifat merusak (*detrimental*) juga dibutuhkan. Dengan demikian persiapan pembuatan media pada masing-masing tahapan produksi embrio menjadi pekerjaan yang menyita waktu para peneliti serta menambah biaya untuk setiap bahan yang ditambahkan.

Upaya penyederhanaan media merupakan terobosan yang diperlukan sehingga waktu yang diperlukan untuk teknik produksi embrio *in vitro* menjadi lebih efisien dengan hasil yang memuaskan. Penyederhanaan penggunaan media selama proses produksi embrio menawarkan keuntungan untuk mengurangi sejumlah masalah akibat perubahan komposisi cairan biologis serta dapat meringankan kerja di laboratorium. Namun demikian, komposisi bahan utama yang mendukung

setiap tahapan kegiatan tetap tersedia, sehingga masih berfungsi layaknya media yang umum digunakan.

*Tissue culture medium* (TCM) 199 merupakan salah satu media umum yang digunakan pada tahapan pertama produksi embrio yaitu pematangan oosit. Berbagai hasil pematangan dengan media tersebut sudah dilaporkan secara luas oleh para peneliti dengan hasil yang memuaskan (Palazs *et al.*, 2000). Berbagai media fertilisasi juga telah dipakai pada sapi seperti *tyrode-albumin-lactate-pyruvate* (TALP), *gradient percoll*, dan lain-lain (Coscioni *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003) yang dianggap mampu menyeleksi spermatozoa secara selektif dan menghasilkan motilitas yang tinggi yang dapat mendukung terjadinya kapasitas spermatozoa sehingga mampu membuahi oosit secara sempurna. Lebih lanjut dikemukakan bahwa daya tahan hidup embrio setelah pembekuan atau pada saat akan ditransfer tergantung pada kultur media yang digunakan (Gomez *et al.*, 2008). Pada tahap perkembangan, media kultur juga telah banyak dicoba dengan berbagai media dari mulai media sederhana hingga media kompleks seperti *synthetic oviduct fluid* (SOF), *potassium simplex optimization medium* (KSOM), *Charles Rosenkrans 1* (CR1) yang dilaporkan menghasilkan embrio dengan jumlah yang tinggi (Kane, 2003; Nedambale *et al.*, 2006), bahkan dengan pergantian media secara simultan dengan komposisi serum yang berbeda (Setiadi *et al.*, 1995), melakukan kultur embrio secara satu per satu (Goovaerts *et al.*, 2011), atau dengan penambahan bahan lainnya seperti hialuronan (Block *et al.*, 2009). Atas dasar banyaknya media yang digunakan dan tahapan yang dilakukan, maka penelitian ini dilakukan untuk melihat kemampuan perkembangan awal embrio sapi *in vitro* dengan menggunakan media tunggal untuk maturasi, fertilisasi, dan kultur berbasal TCM 199.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi dan Pematangan Oosit

Oosit dikoleksi dari ovarium sapi yang diperoleh dari rumah potong hewan. Sebelum koleksi, ovarium disimpan pada larutan fisiologis yang ditempatkan pada tabung penampung yang disimpan pada *waterbath* dengan suhu 37° C. Koleksi oosit dilakukan dengan teknik aspirasi menggunakan spuit dengan jarum 18G. Oosit yang diperoleh diseleksi berdasarkan kekompakan sel kumulus dan sitoplasma yang homogen. Oosit yang terseleksi dilakukan pencucian pada media *phosphat buffer saline* (PBS) yang disuplementasi dengan 10% *fetal bovine serum* (FBS), kemudian dicuci pada media yang sesuai dengan media pematangan yang akan digunakan. Oosit dimatangkan pada media TCM 199 (Gibco, Germany) yang disuplementasi dengan 10 IU/ml *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG, Intervet, Holland), 10 IU/ml *human chorionic gonadotropin* (hCG, Intervet, Holland), 10% FBS (Sigma, USA), dan gentamisin 50 µg/ml (Sigma, USA). Pematangan dilakukan pada

inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada temperatur 39° C selama 24 jam dengan kelembaban maksimum.

### Prosedur Fertilisasi *In Vitro*

Proses fertilisasi *in vitro* dilakukan menggunakan dua metode. Pada metode pertama, dilakukan menggunakan media fertilisasi yang umum (media rutin) untuk produksi embrio *in vitro* (Suzuki *et al.*, 2000). *Thawing* dilakukan terlebih dahulu pada semen yang akan digunakan pada air bersuhu 37° C selama 10 detik kemudian ditempatkan pada media fertilisasi pada tabung untuk kemudian disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 1800 rpm. Pelet hasil sentrifugasi disisakan sekitar 1 ml, kemudian dihitung konsentrasinya. Setelah didapat konsentrasi spermatozoa, kemudian dibuatkan dalam drop-drop kecil dengan konsentrasi akhir 5x10<sup>6</sup> spermatozoa per ml. Pada metode kedua, fertilisasi menggunakan media dasar TCM 199 yang disuplementasi dengan Napirovat, BSA, serta heparin sebagai agen kapasitas spermatozoa. Setelah *thawing* dilakukan pada semen seperti prosedur sebelumnya, semen ditempatkan di dasar media untuk memberikan kesempatan kepada spermatozoa yang motil berenang ke atas (*swim up*) dengan cara diinkubasi pada inkubator CO<sub>2</sub> selama 1 jam. Sebagian permukaan atas larutan diambil, untuk kemudian disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 1100 rpm. Sebagian supernatan hasil sentrifus dibuang, dan pelet yang tersisa diencerkan lagi dengan media fertilisasi untuk kemudian disentrifus kembali dengan waktu dan kecepatan yang sama. Pelet yang terbentuk dari sentrifugasi untuk kedua kalinya, disisakan sekitar 1 ml untuk kemudian dihitung konsentrasinya. Dosis spermatozoa yang digunakan sama dengan metode sebelumnya yaitu 5x10<sup>6</sup> spermatozoa per ml. Oosit yang telah mengalami proses pematangan, dicuci satu kali pada media fertilisasi untuk memberikan kesempatan ekuilibrase dengan media yang digunakan, untuk kemudian ditempatkan pada drop fertilisasi yang berisi spermatozoa. Oosit dan spermatozoa diinkubasi selama 22-24 jam pada inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada temperatur 39° C.

### Kultur Zigot

Setelah dibiarkan berinteraksi antara oosit dan spermatozoa selama 22-24 jam, oosit dipindahkan pada media kultur yang mengandung TCM 199 yang disuplementasi dengan asam amino esensial dan non-esensial (Sigma, USA), serta 10% FBS. Sebelum dipindahkan, pada media kultur terlebih dahulu dilakukan penghilangan sel kumulus (*denudasi*) dengan melakukan pipetan secara berulang. Kultur oosit dilakukan pada inkubator 5% CO<sub>2</sub> pada temperatur 39° C selama 3 hari.

### Pengamatan dan Analisis Data

Pengamatan tingkat perkembangan embrio yang membelah dilakukan setiap hari setelah fertilisasi sampai hari ke-3 dengan mencatat semua perkembangan yang terjadi. Tingkat pembelahan

(*cleavage*) dan perkembangan embrio yang terjadi dibandingkan secara statistik menggunakan uji beda dua proporsi menurut Pagano dan Gauvreu (1993) dan Walpole (1993).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Tingkat Pematangan Inti**

Kontrol tahap perkembangan awal embrio tergantung pada komponen maternal yang dibawa oosit selama masa pertumbuhan dan pematangan (Lequaere *et al.*, 2003). Pada produksi embrio *in vitro*, oosit yang dikoleksi distimulasi untuk mencapai pertumbuhan yang sempurna dan mengalami pematangan inti sampai mencapai tahap metafase II (M-II). Hal ini karena hanya oosit yang matang saja yang memiliki kemampuan untuk dibuahi dan mendukung perkembangan awal embrio.

**Tabel 1.** Tingkat pematangan inti oosit sapi *in vitro*

Jumlah oosit	Tingkat pematangan inti (%)				
	GV	MI	A/T	MII	TD
54	-	7(13,0)	-	44	3(5,5)
				(81,5)	

GV= *germinal vesicle*, MI/MII= metafase I/II, A/T= anafase/telofase  
 TD= tidak terdeteksi

Hasil penelitian menunjukkan lebih dari 80% oosit yang dimatangkan pada media yang digunakan mampu mencapai tahap M-II seperti yang disajikan pada Tabel 1. Hal ini menunjukkan komponen pada media yang digunakan mampu mendukung perubahan inti. Komponen media seperti hormon dan serum diduga mampu mendukung perubahan inti yang terjadi. Hialuronidase diperlukan tidak hanya untuk ekspansi sel kumulus tetapi juga untuk pematangan inti (Marei *et al.*, 2012).

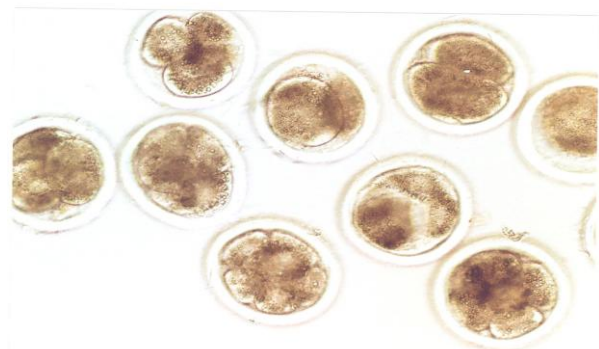
Dalam keadaan *in vivo* pada sapi yang secara alami menganut ovulasi tunggal yaitu hanya satu oosit yang diovulasikan, sementara sisanya akan mengalami atresia. Oleh karena itu, oosit yang mampu berkembang atau mengalami pematangan secara *in vitro* merupakan oosit yang bisa diselamatkan sebelum mengalami atresia (Bilodeau-Goeseels dan Panich, 2002). Hal ini juga membuktikan bahwa pada keadaan *in vitro*, komponen dalam media maturasi yang digunakan memegang peranan penting dalam mendukung terjadinya M-II. Lebih lanjut dikemukakan bahwa tingkat pematangan oosit juga memengaruhi perkembangan embrio selanjutnya. Namun demikian, rata-rata laboratorium kehilangan sekitar 60-70% oosit yang dimatangkan karena tidak mampu berkembang menjadi embrio (Meirelles *et al.*, 2004). Menurut Brum *et al.* (2005), pematangan oosit pada volume media yang sedikit mengurangi tingkat *hatching rate* tanpa mengurangi perkembangan. Pada penelitian ini, pematangan oosit dilakukan pada media dengan volume besar sekitar 2 ml, sehingga indikator awal dukungan perkembangan diperlihatkan dengan jumlah oosit yang matang mencapai tahap M-II sekitar 81,5%. Dengan tingkat kematangan oosit yang tinggi, diharapkan

semakin banyak oosit yang mampu dibuahi dan berkembang menjadi embrio.

**Tingkat Perkembangan Embrio**

Keberhasilan produksi embrio *in vitro* biasanya dinilai dari jumlah embrio yang mencapai tahap morula atau blastosis, mengingat tahapan tersebut tahan terhadap pembekuan dan layak untuk ditransfer ke resipien. Di sisi lain, berbagai faktor juga memengaruhi keberhasilan produksi embrio, seperti kualitas oosit, kemampuan fertilisasi spermatozoa, serta sistem kultur yang digunakan.

Periode produksi embrio *in vitro* terlama disimpan pada media kultur dibandingkan dengan media maturasi dan fertilisasi. Sebagai akibatnya, kultur media memiliki kontribusi yang besar dalam waktu perkembangan awal embrio, kualitas blastosis, serta jumlah sel embrio (Nedambale *et al.*, 2006). Lequaere *et al.* (2003) menyatakan kecepatan pembelahan embrio awal dapat dijadikan indikator untuk menilai kualitas embrio. Lebih lanjut dipercayai pula, embrio sapi mengalami aktivasi genomnya dimulai pada stadium 8-16 sel (Belodeau-Gisselees dan Panich, 2002), dan 8 sel (Meirelles *et al.* 2004), sehingga perkembangan embrio sampai tahap 8 sel tergantung pada genom maternal yang dibawa oleh oosit. Lebih lanjut dinyatakan sebagian besar kegagalan perkembangan embrio *in vitro* terjadi antara dua sel dan tahap blastosis (Gomez *et al.*, 2008). Hal ini mengindikasikan bahwa kultur embrio pasca fertilisasi merupakan periode kritis yang menentukan kecepatan pembelahan (Loneragan *et al.*, 2004; Nedambale *et al.*, 2006), dan kualitas embrio (Gomez *et al.*, 2008). Oleh karenanya, parameter yang digunakan pada penelitian ini adalah pengamatan kemampuan tingkat pembelahan embrio awal (2 sel) dan jumlah embrio tahap selanjutnya (4-8 sel) dengan membandingkan media tunggal dengan media yang lazim digunakan untuk setiap tahapan kegiatan produksi embrio *in vitro* (maturasi, fertilisasi, dan kultur).



**Gambar 1.** Embrio sapi tahap 2-8 sel hasil produksi *in vitro*

Dari Tabel 2 dan Gambar 1 terlihat bahwa oosit pada media berbahan dasar TCM 199 mampu untuk difertilisasi dan melakukan tingkat pembelahan awal (*cleavage*) dengan sempurna meskipun jumlah perkembangan embrio awal lebih sedikit dibandingkan dengan pada media rutin dengan persentase masing-

masing adalah 23,2 dan 44,4%. Jika ditelaah lebih lanjut, perbedaan dari kedua perlakuan tersebut diduga terletak pada media fertilisasi dan komposisinya. Salah satu kemungkinan yang terjadi, karena pada media bahan dasar TCM hanya sedikit mengandung agen kimia yang bisa menyebabkan kapasitas sperma (BSA dan heparin) dibandingkan dengan media fertilisasi rutin yang sudah dilengkapi dengan banyak agen kimia yang mendukung kapasitas (BSA, kafein, dan  $\text{CaCl}_2$  sebagai agen reaksi akrosom). Sementara itu Coscioni *et al.* (2001) menyatakan penambahan kafein dapat menyebabkan peningkatan kapasitas spermatozoa, sehingga kuat dugaan rendahnya tingkat pembelahan pada media berbahan dasar TCM disebabkan oleh sedikitnya oosit yang terbuahi. Hal ini kemungkinan daya penembusan spermatozoa masih rendah, meskipun motilitas spermatozoa pada hari berikutnya setelah fertilisasi memperlihatkan gerakan yang masih bagus. Menurut Gadella dan van Gastel (2004) motilitas spermatozoa yang hiperaktif tidak merupakan hasil satu-satunya dari proses kapasitas. Lebih lanjut Gordon (2003) menyatakan heparin merupakan agen kapasitas tetapi bukan agen reaksi akrosom dan bahkan sperma sapi memperlihatkan perbedaan kebutuhan konsentrasi heparin untuk terjadinya kapasitas (Lu dan Siedel, 2004). Di sisi lain, jumlah embrio yang mencapai tahap 4-8 sel (Gambar 1) dalam waktu 72 jam dengan media rutin lebih banyak dibandingkan dengan media tunggal berbahan dasar TCM 199, meskipun secara statistik tidak berbeda nyata (Tabel 2).

**Tabel 2.** Tingkat perkembangan embrio sapi *in vitro*

Perlakuan	Total oosit	Tingkat pembelahan embrio (%)			Tingkat Pembelahan (%)
		2 sel	4 sel	8 sel	
Media tunggal	56	8 (61,5)	4 (30,8)	1 (7,7)	23,2 <sup>a</sup>
Media rutin	54	11 (45,8)	7 (29,2)	6 (25,0)	44,4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Superskrip yang sama pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan ( $P > 0,05$ )

Waktu terjadinya pembelahan (*cleavage timing*) merupakan titik kritis karena embrio yang lebih awal berkembang memiliki potensi lebih besar (Meirelles *et al.*, 2004; Nedambale *et al.*, 2006). Hal ini diakibatkan karena sifat yang diwariskan oleh sitoplasma dan berkorelasi dengan fungsi transisi maternal zigot (Meirelles *et al.*, 2004). Pada penelitian ini jumlah embrio yang membelah lebih banyak dan waktu pembelahan embrio pada media rutin lebih cepat dibandingkan dengan media tunggal. Kecepatan pembelahan embrio lebih lanjut (4-8 sel) juga lebih banyak terjadi pada media rutin dibandingkan dengan media tunggal. Dari segi perkembangan, embrio yang memiliki tingkat perkembangan lebih cepat memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan dengan yang lambat. Hal ini karena kualitas yang diturunkan melalui sitoplasma dan berkorelasi dengan fungsi transisi maternal zigot (Meirelles *et al.*, 2004). Dari data yang

diperoleh mengindikasikan embrio pada media rutin cenderung lebih kompeten dibandingkan dengan media tunggal yang ditunjukkan dengan banyaknya embrio yang membelah pada tahap berikutnya (4-8 sel), sementara pada media tunggal lebih banyak tertahan pada tahap 2 sel. Lebih lanjut dikemukakan bahwa sebagian besar aktivasi genom muncul pada saat 8 sel dan transisi dari maternal ke embrio terjadi saat 8 sel (Meirelles *et al.*, 2004). Perbedaan perkembangan embrio pada kedua perlakuan lebih diakibatkan oleh kemampuan media fertilisasi untuk melakukan kapasitas spermatozoa. Di samping itu, kemungkinan lainnya yang menyebabkan masih rendahnya perkembangan embrio lanjut adalah dukungan dari kualitas media kultur pasca fertilisasi (Lonergan *et al.*, 2004), karena banyak peneliti melaporkan system kultur yang lebih baik pada media SOF dan modifikasinya yang lebih cocok untuk embrio sapi (Nedambale *et al.*, 2006). Pengaruh serum yang ditambahkan dalam media kultur juga diduga menghambat perkembangan awal embrio meskipun berpengaruh positif pada perkembangan morula dan blastosis (Gomez *et al.*, 2008). Perbedaan individu oosit yang diindikasikan dengan perbedaan berbagai parameter seperti jumlah mitokondria dapat menyebabkan perbedaan kualitas embrio yang dihasilkan (Tammasia *et al.*, 2004).

## KESIMPULAN

Media tunggal berbahan dasar TCM 199 mampu mendukung perkembangan embrio sapi tahap awal secara *in vitro*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah mendanai penelitian ini melalui Penelitian Hibah Kompetensi Nomor Kontrak: 148/SP2H/PL/Ditlitabmas/III/2012.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bilodeau-Goeseels, S. and P. Panich. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 71:143-155.
- Block, J., L. Bonilla, and P.J. Hansen. 2009. Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology* 71:1063-1071.
- Brum, D.S., F.G. Leivas, C.A.M. Silva, M.I.B. Rubin, L.P. Rauber, S.S. Fialho, L.F.C. Pilla, and M.L. Bernardi. 2005. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod.* 2(1):70-73.
- Coscioni, A.C., H.D. Reichenbach, J. Schwartz, V.S.N. LaFalci, J.L. Rodriguez, and A. Brandelli. 2001. Sperm function and production of bovine embryo *in vitro* after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 67:59-67.
- Gadella, B.M. and R.A. van Gastel. 2004. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83:307-319.
- Gomez, E., A. Rodriguez, M. Munoz, J.N. Kamano, C.O. Hidalgo, E. Moran, N. Facal, and C. Diez. 2008. Serum free embryo

- culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology** 69:1013-1021.
- Goovaerts, I.G.F., J.L.M.R. Leroy, D. Rizos, P. Bermejo-Alvarez, A. Gutierrez-Adan, E.P.A. Jorssen, and P.E.J. Bols. 2011. Single *in vitro* bovine embryo production: Coculture with autologous cumulus cells, developmental competence, embryo quality and gene expression profiles. **Theriogenology** 76:1293-1303.
- Gordon, I. 2003. **Laboratory Production of Cattle Embryos**. 2<sup>nd</sup> ed. CABI Publishing, CAB International, Willingford, UK.
- Kane, M.T. 2003. A review of in vitro gamet maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. **Anim. Reprod. Sci.** 79:171-190.
- Lequaere, A.S., J. Marchandase, B. Moreau, A. Massip, and I. Donnay. 2003. Cell cycle at the time of maternal zygotic. **Biol. Reprod.** 69:1707-1713.
- Lonergan, P., H.G. Pedersen, D. Rizos, T. Greve, P.D. Thomsen, T. Fair, A. Evans, and M.P. Boland. 2004. Effect of post fertilization culture environment on incidence of chromosome aberration bovine blastocyst. **Biol. Reprod.** 71:1096-1100.
- Lu, K.H. and J.E. Siedel Jr. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically sorted-sperm. **Theriogenology** 62:819-830.
- Marei, W.F., F. Ghafari, and A.A. Fouladi-Nashta. 2012. Role of hyaluronic acid in maturation and further early embryo development of bovine oocytes. **Theriogenology** 78:670-677.
- Meirelles, F.V., A.R. Caetano, Y.F. Watanabe, P. Ripamonte, S.F. Carambula, G.K. Merighe, and S.M. Garcia. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.** 82-83:13-20.
- Nedambale, T.L., F. Du., X. Yang, and X.C. Tian. 2006. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced blastocysts following culture in defined medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. **Anim. Reprod. Sci.** 93: 61-75
- Pagano, M. and K. Gauvreu. 1993. **Principles of Biostatistics**. Duxbury Press, Belmont, California.
- Palazs, A.T., J. Thundathil, R.E. Verrall, and R.J. Mapletoft. 2000. The effect of macromolecular supplementation on the surface tension of TCM-199 and the utilization of growth factors by bovine oocytes and embryos in culture. **Anim. Reprod. Sci.** 58: 229-240.
- Setiadi, M.A., J. Pelli, and K. Schellander. 1995. Effect of substituton of fetal calf serum with estrous cow serum on blastocyst development embryo produced in vitro. **Hemerazoa**. 77(1):15-19.
- Suzuki, K., B. Eriksson, H. Shimizu, T. Nagai, and H. Rodriguez-Martinez. 2000. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. **Int. J. Andol.** 23:13-21
- Suzuki, K., M. Geshi, N. Yamauchi, and T. Nagai. 2003. Functional changes and motility characteristics of Japanese Black bull spermatozoa separated by Percoll. **Anim. Reprod. Sci.** 77:157-172
- Tammasia, M., F. Nutinck, P. May-Panloup, P. Reynier, Y. Heyman, G. Charpigy., M. Stojkovic, S. Heindleder, J.P. Renard, and S. Chastant-Maillard. 2004. In vitro embryo production efficiency in cattle, and its association with oocyte adenosine triphosphat content quantity mitochondrial DNA and mitochondrial DNA haplogroup. **Biol. Reprod.** 71:697-704.
- Walpole, R.E. 1993. **Pengantar Statistika**. (Diterjemahkan B. Sumantri). PT Gramedia, Jakarta.