

# PENGARUH PENAMBAHAN HORMON PADA MEDIUM PEMATANGAN TERHADAP PRODUKSI EMBRIO SECARA *IN VITRO*

POLMER SITUMORANG, ENDANG TRIWULANINGSIH, ADRIANA LUBIS, NURHASANAH HIDAYATI, dan TATIT SUGIARTI

Balai Penelitian Ternak  
P.O. Box 221, Bogor 16002, Indonesia

(Diterima dewan redaksi 25 Maret 1997)

## ABSTRACT

SITUMORANG, P., E. TRIWULANINGSIH, A. LUBIS, N. HIDAYATI, and T. SUGIARTI. 1998. Effects of the addition of hormone in maturation medium for *in vitro* production of embryo (IVP). *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (1): 22-26.

A study on the effects of hormone FSH, hCG and estrogen in maturation medium on embryo production (IVP) was conducted. Ovaries of dairy cows were obtained from slaughtered house and oocytes were collected by aspiration and slicing. Oocytes were matured in TCM-199 media containing one of each hormonal treatments : 10 ug/ml FSH, 2 IU hCG, 1 ug/ml estrogen, 10 ug/ml FSH + 2 IU hCG, 10 ug/ml FSH + 1 ug/ml estrogen, and 10 ug/ml FSH + 2 IU hCG + 1 ug/ml estrogen for 24 hours. Fertilization was conducted in thyroid albumin lactate pyruvate (TALP) media containing 10 ug/ml heparin for 18-24 hours and co-cultured in synthetic oviduct fluid (*Sof-media*) using CO<sub>2</sub> incubator at 38°C. Every 48 hours the embryos were moved into fresh *Sof media* and embryo evaluation was done on day 7 using a microscope. From a total of 293 oocytes studied resulted 60.4% of zygotes which develop to 9.4% young embryos ( cell numbers <16), 45.3% morulae and 5.7% blastocysts. Hormones used singly did not significantly affect the production of embryo. The highest mean percentages of fertilization was obtained in FSH (73.3%) and the lowest in estrogen (59.6%), but the mean percentage of blastocyst was higher in estrogen. The mean percentages of young embryos, morulae and blastocysts were 4.8, 66.1, 2.4; 18.8, 41.6, 6.6 and 3.3, 46.6, 10.0 for FSH, hCG and estrogen, respectively. Using a combination of FSH with hCG and estrogen did not significantly increase the production of embryo. The mean percentages of fertilization, young embryo, morulae and blastocysts were 55.2, 9.3, 43.4 and 2.6; 51.7, 4.8, 35.8 and 11.1 and 56.0, 12.3, 42.3 and 1.4 for FSH+hCG, FSH+estrogen and FSH+hCG+estrogen respectively.

**Keywords:** Embryo, fertilization, hormone, *in vitro*

## ABSTRAK

SITUMORANG, P., E. TRIWULANINGSIH, A. LUBIS, N. HIDAYATI dan T. SUGIARTI. 1998. Pengaruh penambahan hormon pada medium pematangan terhadap produksi embrio secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 3 (1): 22-26.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh hormon FSH, hCG dan estrogen dalam medium pematangan terhadap produksi embrio. Sel telur dikumpulkan secara aspirasi dan slising dari indung telur sapi perah yang berasal dari rumah potong hewan, dimatangkan selama 24 jam dalam medium TCM-199 yang mengandung salah satu perlakuan hormon, yaitu 10 ug/ml FSH; 2 IU hCG; 1 ug/ml estrogen; 10 ug/ml FSH + 2 IU hCG; 10 ug/ml FSH + 1 ug/ml estrogen dan 10 ug/ml FSH + 2 IU hCG + 1 ug/ml estrogen. Pembuahan selama 18-24 jam dalam medium *thyroid albumin lactate pyruvate* (TALP) yang mengandung 10 ug/ml heparin dan pembiakan dengan *synthetic oviduct fluid* (*Sof-media*) menggunakan CO<sub>2</sub> inkubator pada suhu 38°C. Medium pembiakan diganti setiap 48 jam dan pada hari ke-7 embrio dievaluasi dengan menggunakan mikroskop. Dari total 293 sel telur yang diteliti menghasilkan pembuahan 60,4% dan berkembang menjadi 9,4 % embrio muda (jumlah sel<16), 45,3 % morula dan 5,7 % blastosista. Penggunaan hormon tunggal tidak mempengaruhi produksi embrio. Rataan pembuahan yang tertinggi didapat pada perlakuan FSH (73,3%) dan yang terendah pada estrogen (59,6%) dan sebaliknya rataaan blastosista didapat lebih tinggi pada estrogen. Rataan embrio muda, morula dan blastosista adalah (4,8; 66,1; 2,4), (18,8;41,6; 6,6) dan (3,3; 46,6; 10) untuk masing-masing FSH, hCG dan estrogen. Pemberian baik kombinasi FSH dengan hCG maupun estrogen tidak nyata meningkatkan rataaan produksi embrio. Rataan pembuahan, embrio muda, morula dan blastosista adalah 55,2; 9,3, 43,4 dan 2,6; 51,7, 4,8, 35,8 dan 11,1 dan 56,0, 12,3, 42,3 dan 1,4 untuk masing-masing FSH+hCG; FSH+estrogen dan FSH+hCG+estrogen.

**Kata kunci:** Embrio, pembuahan, hormon, *in vitro*

## PENDAHULUAN

Untuk mengantisipasi meningkatnya permintaan akan daging dan susu, maka perlu dilakukan usaha meningkatkan populasi sapi potong dan sapi perah baik secara kuantitas maupun kualitas. Salah satu usaha untuk meningkatkan produksi ternak sapi di Indonesia adalah meningkatkan reproduksi melalui bioteknologi reproduksi seperti transfer embrio (TE). Produksi embrio secara *in vivo* telah banyak dilaporkan, akan tetapi aplikasi teknologi ini masih sangat terbatas, karena harga hormon untuk superovulasi cukup mahal di samping respons donor yang sangat bervariasi terhadap penyuntikan hormon. Teknologi produksi embrio secara *in vitro* (IVP) adalah alternatif untuk menghasilkan sapi berkualitas baik dengan biaya yang rendah, sehingga dapat meningkatkan nilai komersial anak sapi yang dihasilkan. Teknologi IVP mencakup pengambilan sel telur dari ovarium (*oocyte recovery*), pematangan sel telur *in vitro* (IVM), pembuahan *in vitro* (IVF) dan pembiakan (*co-culture*).

Kelahiran pertama anak sapi dari hasil IVM dan IVF dilaporkan pada tahun 1985. Perkembangan yang sangat cepat dalam teknologi IVF, memungkinkan memproduksi embrio dalam jumlah yang banyak dengan harga murah. Keberhasilan untuk menghasilkan embrio dari sel telur yang belum matang (follikel < 6 mm) dipengaruhi banyak faktor, antara lain kualitas sel telur, medium selama pematangan, kualitas spermatozoa dan kondisi dari pembiakan. Jenis medium, protein dan hormon selama pematangan sel telur sangat mempengaruhi produksi embrio secara *in vitro* (FUKUI dan ONO, 1989; BAVISTER *et al.*, 1992). Umumnya medium TCM-199 telah banyak digunakan untuk preparasi dan pematangan (MERMILLOD *et al.*, 1992; SHIOYA, 1993; TROUNSON *et al.*, 1994). Penambahan hormon gonadotrophin dan estrogen telah dilaporkan beberapa peneliti, akan tetapi hasil yang didapat masih sangat bervariasi dari setiap laboratorium (BRACKETT dan ZUELKE, 1993; TOTEY *et al.*, 1993; TROUNSON *et al.*, 1994).

Pengaruh pemberian hormon gonadotrophin dan estrogen terhadap sel telur dengan berbagai kualitas sel *cumulus* masih belum jelas. HEINSLEIGH dan HUNTER (1985) melaporkan bahwa sel telur sapi yang dikultur dengan menggunakan FSH ternyata lebih baik berkembang menjadi sel telur dewasa dibandingkan dengan LH (56 vs 39%). Sebaliknya BRACKETT dan ZUELKE (1993) melaporkan bahwa pemberian LH dapat meningkatkan metabolisme sel, sedangkan FSH tidak berpengaruh. Tujuan penelitian ini adalah untuk melihat pengaruh pemberian hormon FSH, hCG dan estrogen secara tunggal atau kombinasi pada proses pematangan sel telur oosit yang berasal dari rumah potong hewan terhadap produksi embrio secara *in vitro*.

## MATERI DAN METODE

### Sel telur

Indung telur sapi yang dipotong di rumah potong hewan di Jakarta diambil secepat mungkin setelah sapi dipotong, kemudian dibersihkan dengan aquades sebelum disimpan dalam termos yang berisi larutan PBS dengan suhu 35°C. Indung telur dibawa ke laboratorium IVF Balitnak Bogor dan suhu dipertahankan pada 35°C selama kurang lebih 2 jam perjalanan. Sel telur oosit ditampung dengan metode aspirasi atau (penigirisan) dan kemudian disimpan dalam larutan Bench.

### Pematangan

Sel telur dengan sel cumulus (*cumulus-enclosed oocytes*) dicuci 2 kali dalam larutan Bench sebelum dibagi secara acak ke medium pematang (maturasi) TCM-199 yang diberi hormon (6 hormon perlakuan), yaitu 10 ug FSH/ml; 2 IU hCG; 1 ug estrogen/ml; 10 ug FSH + 2 IU hCG/ml; 10 ug FSH+1 ug estrogen/ml dan 10 ug FSH + 2 IU hCG + 1 ug estrogen/ml. Sel telur di dalam masing-masing perlakuan kemudian dimatangkan dengan menggunakan inkubator CO<sub>2</sub> dengan 5% CO<sub>2</sub> di udara dan suhu 38°C selama 24 jam.

### Pembuahan

Dua *straw* semen beku dari bangsa sapi yang sama dicairkan (*thawing*) pada suhu 35°C dan dicampur ke 1 ml medium Sperm TALP (*thyroid albumin lactate pyrhvate*). Larutan campuran sperma dituangkan ke permukaan larutan sperm TALP dengan 50, 70 dan 90% percoll dan disentrifuse pada 600 G selama 20 menit. Pellet yang terbentuk dicuci dengan 5 ml medium pembuahan (fertilisasi) TALP yang mengandung 10 ug heparin/ml dan disentrifuse kembali pada 300 G selama 10 menit. Supernatan dibuang dengan menggunakan pipet dan konsentrasi sperma dihitung dengan menggunakan hematisometer.

Bersamaan dengan persiapan sperma, sel telur yang telah dimatangkan pada inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam dicuci berturut-turut 2 kali dalam larutan Bench dan 1 kali dalam medium fertilisasi TALP dan 10 sel telur dari masing-masing perlakuan ditempatkan pada satu drop Fertilization Talp. Larutan sperma yang telah dikapasitasi ditambahkan ke tetes sel telur untuk mendapatkan konsentrasi sperma sebesar 2 juta /ml dan disimpan di dalam inkubator dengan 5% CO<sub>2</sub> di udara dan suhu 38°C selama 18-24 jam.

### P pembiakan (*Co-culture*)

Setelah pembuahan selama 18-24 jam pada medium fertilisasi TALP, zigot dikeluarkan dan dimasukkan ke dalam larutan Bench dan vortex dilakukan selama 1

menit. Pemiakan dilakukan dengan memasukkan masing-masing 4 zigot pada *synthetic oviduct fluid* (Sof media) pada inkubator CO<sub>2</sub> dengan 5% CO<sub>2</sub> di udara, suhu 38°C selama 48 jam. Kemudian setiap 48 jam dilakukan penggantian medium lama dengan medium yang baru. Perkembangan embrio dievaluasi setelah 6 hari dari waktu fertilisasi (hari ke-7 setelah penampungan sel telur) dengan menggunakan mikroskop.

#### Analisis statistik

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan 6 hormon perlakuan. Setiap kunjungan ke rumah potong hewan adalah merupakan ulangan perlakuan yang dalam hal ini setiap sel telur yang tertampung dibagi secara acak ke 6 perlakuan yang diteliti. Data yang dikumpulkan adalah persentase pemuahan, embrio muda (jumlah sel <16), morula dan blastosista yang didapat dari sejumlah sel telur yang digunakan pada setiap kunjungan.

### HASIL

Sebanyak 293 sel telur telah diperoleh dari 36 indung telur sapi perah dan dibuahi secara *in vitro* dengan menggunakan semen beku dari bangsa sapi yang sama. Diperoleh variasi hasil yang sangat besar dari setiap ulangan pelaksanaan dan rata-rata sel telur yang terbuahi adalah 60,4 % (kisaran 0 - 100%). Dari

total sel telur yang terbuahi, yang berkembang menjadi embrio muda (jumlah sel <16) 9,4%, morula 45,3% dan blastosista 5,7%. Pengaruh pemberian hormon baik tunggal maupun kombinasi terhadap produksi embrio secara *in vitro* terlihat pada Tabel 1 dan 2. Tidak dapat pengaruh yang nyata secara statistik dari jenis hormon yang diberikan pada waktu pematangan sel terhadap rata-rata persentase basik sel telur yang terbuahi (*fertilized oocytes*), embrio muda, morula maupun blastosista. Keberhasilan pemuahan secara *in vitro* yang tertinggi (73,3%) terdapat pada pemberian hormon FSH. Tidak ada perbedaan yang nyata secara statistik antara pemberian hormon secara tunggal dan pemberian kombinasi 2 atau 3 hormon, bahkan ada kecenderungan rata-rata persentase sel telur yang tidak terbuahi lebih tinggi pada pemberian hormon secara kombinasi dibandingkan dengan pemberian tunggal. Pemberian hormon estrogen cenderung memberikan hasil sel telur terbuahi yang lebih rendah (59,6%) dibandingkan dengan pemberian FSH (73,3%) atau hCG (66,8%). Walaupun demikian, pemberian hormon estrogen cenderung mempercepat perkembangan embrio dimana rata-rata persentase blastosista yang didapat lebih tinggi baik pada pemberian tunggal (10,0%) maupun pemberian kombinasi dengan FSH (11,1%). Pemberian hCG cenderung memperlambat perkembangan embrio yang rata-rata persentase embrio mudanya lebih tinggi baik pada pemberian hCG tunggal (18,8%) maupun kombinasi dengan FSH (9,3%).

**Tabel 1.** Pengaruh pemberian hormon terhadap rata-rata persentase pemuahan *in vitro* (IVF)

Perlakuan	n	Total sel telur	Persentase pemuahan	
			Rataan	Kisaran
FSH	6	43	73,3	0 - 100
hCG	8	57	66,8	33 - 100
Estrogen	6	41	59,6	0 - 100
FSH+hCG	7	50	55,2	11 - 100
FSH+Estrogen	7	50	51,7	0 - 100
FSH+hCG+Estrogen	7	52	56,0	14 - 100

**Tabel 2.** Pengaruh pemberian hormon terhadap rata-rata persentase embrio muda, morula dan blastosista

Perlakuan	Embrio Muda		Morula		Blastosista	
	Rataan	Kisaran	Rataan	Kisaran	Rataan	Kisaran
FSH	4,8	0-39	66,2	25-100	2,4	0-14
hCG	18,8	0-67	41,6	17-100	6,6	0-22
Estrogen	3,3	0-20	46,3	0-100	10,0	0-40
FSH+hCG	9,3	0-36	43,4	0-86	2,6	0-18
FSH + Estrogen	4,8	0-22	35,8	9-67	11,1	0-44
FSH+hCG+Estrogen	12,3	0-75	42,3	14-100	1,4	0-10

## PEMBAHASAN

Besarnya kisaran hasil yang diperoleh dalam penelitian ini berhubungan dengan variasi kualitas sel telur yang digunakan pada setiap ulangan. Dalam penelitian ini sel telur diperoleh dari rumah potong hewan di Jakarta yang waktu pemotongannya tidak selalu sama, sehingga waktu dari saat pengambilan indung telur sampai proses pematangan di laboratorium juga sangat bervariasi. Walaupun selama perjalanan indung telur dipertahankan pada larutan PBS, akan tetapi waktu yang cukup lama (sekitar 2 jam) akan mempengaruhi kualitas sel telur. Hasil ini didukung oleh laporan YEUNG *et al* (1992) yang menyatakan bahwa makin bertambah lama penyimpanan ovarium akan menurunkan keberhasilan pembuahan *in vitro* (IVF). Lebih lanjut dilaporkan bahwa waktu yang panjang antara pengambilan ovarium dan proses maturasi juga sangat mempengaruhi perkembangan sel telur yang telah terbuahi menjadi blastosista.

Hasil pembuahan yang didapat dalam penelitian ini lebih kecil dibandingkan dengan laporan IM *et al.* (1995) yaitu sebesar 75-100%. Perbedaan yang dihasilkan berhubungan dengan kualitas sel telur dan konsentrasi spermatozoa yang digunakan. Dalam penelitian ini sel telur yang digunakan tidak terseleksi, sedang peneliti terdahulu hanya menggunakan sel telur dengan morfologi yang baik. Hasil pembuahan dengan menggunakan konsentrasi 2 juta spermatozoa dalam penelitian ini mungkin belum optimal dan hal ini mendukung hasil yang diperoleh IM *et al.* (1995) bahwa peningkatan konsentrasi spermatozoa dari 1,6 juta menjadi 5,0 juta/ml akan meningkatkan persentase pembuahan dari 28,2% menjadi 100%. Perkembangan dari sel telur yang terbuahi menjadi blastosista juga jauh lebih rendah daripada yang dilaporkan oleh peneliti-peneliti terdahulu (XU *et al.*, 1992; TROUNSON *et al.*, 1994), yaitu berkisar antara 34-46%. Rendahnya persentase blastosista dalam penelitian ini membuktikan bahwa pembiakan pada medium sintetis dengan kondisi gas 5% CO<sub>2</sub> di udara belum optimal, karena kadar O<sub>2</sub> yang tidak terkontrol. TROUNSON *et al.* (1994) melaporkan bahwa kadar O<sub>2</sub> sangat mempengaruhi persentase blastosista yakni bahwa 7% O<sub>2</sub> memberi hasil yang lebih tinggi dibandingkan 20% O<sub>2</sub> baik pada medium sintetis maupun medium yang mengandung sel-sel epitel dan granulosa. Hasil yang lebih baik pada pemberian hormon FSH dibandingkan dengan hCG dan estrogen berhubungan dengan kondisi sel telur yang digunakan. Akibat terbatasnya jumlah indung telur, maka metode pengambilan sel telur dengan *slicing* memungkinkan sel telur yang sangat muda (diameter follikel < 1 mm) banyak terikut dalam penelitian dan sebagai konsekuensinya sel-sel telur tersebut lebih responsif terhadap FSH. Hasil ini sesuai dengan hasil yang dilaporkan SANBUISSHO dan THRELFALL (1988) dan IM *et al.* (1995) yang menunjukkan bahwa FSH mempunyai pengaruh yang lebih baik

dibandingkan dengan LH ataupun estrogen untuk pematangan dan pembuahan sel. Walaupun rataan persentase pembuahan cenderung lebih rendah pada hCG dibandingkan dengan FSH akan tetapi pemberian hormon hCG pada proses pematangan sel telur lebih konsisten dibandingkan dengan FSH dan estrogen. Hal ini terbukti dengan keberhasilan pembuahan yang selalu didapat pada setiap ulangan pelaksanaan IVF (kisaran persentase pembuahan yang lebih kecil) pada pemberian hCG baik pemberian tunggal ataupun kombinasi dengan FSH ataupun estrogen. Kebaikan pemberian hCG terhadap pematangan sel telur adalah kemampuan hormon tersebut mempengaruhi langsung metabolisme sel. Hasil yang lebih rendah dari pemberian FSH yang dikombinasikan dengan hCG ataupun estrogen berbeda dengan yang dilaporkan banyak peneliti terdahulu. Pemberian hormon gonadotrophin akan meningkatkan keberhasilan IVF dan pemberian kombinasi FSH, LH dan estrogen akan memberikan hasil yang lebih baik (SIRARD *et al.*, 1988; DOMINKO dan FIRST, 1992; IM *et al.*, 1995). Hasil perolehan yang lebih rendah dari pemberian kombinasi hormon dalam penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang selaras dari hormon-hormon yang bersangkutan. Alasan lain yang dapat diambil adalah akibat umur sel telur yang masih muda dan kualitas sel kumulat yang rendah mengakibatkan keefektifan penggunaan hormon LH ataupun estrogen tidak optimal sehingga penambahan LH dan estrogen tidak memberi nilai tambah. Hasil ini sama dengan yang dilaporkan oleh TOTEY *et al.* (1993) bahwa tidak ada perbedaan yang nyata baik pemberian hormon secara tunggal maupun kombinasinya dalam pematangan sel telur kerbau.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Hormon gonadotrophin (FSH dan hCG) dan estrogen dapat digunakan dalam proses pematangan sel telur untuk tujuan memproduksi embrio secara *in vitro*. Tidak ada perbedaan yang nyata antara hormon FSH, hCG dan estrogen, akan tetapi hormon FSH memberikan rataan persentase sel telur terbuahi yang lebih tinggi dibandingkan dengan hCG maupun estrogen. Pemberian hCG cenderung memberikan hasil pembuahan lebih konsisten. Pemberian kombinasi FSH dengan hCG ataupun estrogen tidak nyata memberikan nilai tambah untuk menghasilkan embrio secara *in vitro*.

Untuk meningkatkan produksi embrio baik secara kuantitas maupun kualitas dengan harga yang murah dapat dilakukan dengan teknologi IVP, yaitu dengan menggunakan sel telur yang berasal dari rumah potong hewan. Hasil yang optimum dapat dicapai dengan menyeleksi sel telur sebelum dimatangkan dan menggunakan medium pematangan yang mengandung hormon gonadotrophin ataupun steroid. Untuk

menghasilkan anakan yang berkualitas baik sel telur harus bersumber dari induk yang memproduksi tinggi dan dibuahi oleh spermatozoa yang unggul pula. Peluang untuk mendapatkan sel telur sapi perah yang unggul pada kondisi peternakan di Indonesia saat ini sangat besar karena generasi pertama sapi perah impor telah dan akan memasuki rumah potong. Melalui penguasaan teknologi pematangan sel telur secara *in vitro* juga akan memungkinkan menghasilkan embrio sapi perah unggul dengan menggunakan sel telur bersumber dari rumah potong hewan di luar negeri seperti misalnya Amerika Serikat, Selandia Baru, Australia, yang rataan produksi susunya sudah tinggi.

#### UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Kepala Dinas Peternakan DKI Jakarta dan Kepala Rumah Potong Hewan DKI Jakarta beserta para staf atas bantuan dan kerja sama dalam menyediakan indung telur sapi perah.

#### DAFTAR PUSTAKA

- BAVISTER, B.D., T.A. ROSE-HELLEKANT, and T. PINYOPUMMINTR. 1992. Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology* 17:127-146.
- BRACKETT, B.G. and K.A. ZUELKE. 1993. Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39: 43-64.
- DOMINKO, T. and N.L. FIRST. 1992. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotrophins. *Theriogenology* 37: 203.
- FUKUI, Y. and H. ONO. 1989. Effects of sera, hormone and granulosa cells added to culture medium for *in vitro* maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.* 86: 501-506.
- HEINSLEIGH, Y. and A.G. HUNTER. 1985. *In vitro* maturation of bovine cumulus enclosed primary oocytes and their subsequent *in vitro* fertilization and cleavage. *J. Dairy Sci.* 68: 1456 - 1482.
- IM, K.S., H.J. KIM, K.M. CHUNG, H.S. KIM, and K.W. PARK. 1995. Effects of ovary type, oocyte grade, hormone, sperm concentration and fertilization medium on *in vitro* maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Asia J. Anim. Sci.* 8: 123-127.
- MERMILLOD, P., C. WILS, A. MASSIP, and F. DESSY. 1992. Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J. Reprod. Fert.* 96: 717- 723.
- SANBUISSHO, A. and W.R. THRELFALL. 1988. The influence of serum and gonadotrophin on bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 29: 301.
- SHIOYA, Y. 1993. Calf production by *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *JARQ* 26: 287-293.
- SIRARD, M.A., J.J. PARRISH, C.B. WARE, M.L. LEIBRIED-RUTLEDGE, and N.L. FIRST. 1988. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biol. Reprod.* 39: 546-552.
- TROUNSON, A., J. PUSHETT, L.J. MACLELLAN, L. LEWIS, and D.K. GARDNER. 1994. Current status of IVM/IVF and embryo culture in humans and farm animals. *Theriogenology* 41: 57-66.
- TOTEY, S.M., C.H. PAWSHE, and G.P. SINGH. 1993. *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): Effects of media, hormones and sera. *Theriogenology* 39:1153-1171.
- XU, K.P., B.R. YAQUB, R.W. RORIE, L. PLANTE, K.J. BETTERIDGE, and W.A. KING. 1992. Developments and viability of embryos derived from oocytes matured and fertilized *in vitro* and cocultured with bovine oviduct epithelial cells. *J. Reprod. Fert.* 94: 33-43.
- YEUNG, W.S.B., P.C. HO, E.Y.L. LAU, and S.T.H. CHAN. 1992. Improved development of human embryos *in vitro* by a human oviductal cell co-culture system. *Hum. Reprod.* 7: 1144-1149.