

# Penggunaan Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG) dalam Pematangan *In Vitro* Oosit Sapi

ZAITUNI UDIN<sup>1</sup>, JASWANDI<sup>1</sup>, TINDA AFRIANI<sup>1</sup> dan LEONARDO E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dosen Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang  
<sup>2</sup>Mahasiswa Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Kampus Limau Manis, Padang

(Diterima dewan redaksi 29 Mei 2006)

## ABSTRACT

UDIN, Z., JASWANDI, T. AFRIANI and LEONARDO E. 2007. Use of pregnant mare's sera gonadotropin (PMSG) in media *in vitro* maturation of cow oocytes. *JITV* 12(1): 55-59.

It is known that hormone addition in media helps *in vitro* maturation of oocyte. This research was aimed to determine the effect of PMSG in media to maturation rate and nucleous development of cow oocyte. Ovaries were obtained from local slaughterhouse. The media used for *in vitro* maturation of oocyte was TCM-199 and the treatment was 3 levels of PMSG: 0, 10 and 20 mg/ml. Result of this research showed that the dose of PMSG in maturation media was significantly affected ( $P < 0.05$ ) nucleolus development of oocytes and maturation rate. The average of germinal vesicle (GV) stage in 3 levels of PMSG 0, 10 and 20 mg/ml were 38.33; 12.64 and 9.64%, respectively. There was no germinal vesicle breakdown (GVBD) found in 3 levels of PMSG addition. The nucleolus development of metaphase-I (M-I) were 7.64; 20.2 and 22.00%, but the average of maturation rate (M-II) was 16.32; 48.10 and 35.34% for 3 levels of PMSG: 0, 10 and 20 mg/ml, respectively. It is concluded that 10 mg/ml PMSG in media of *in vitro* maturation results in the highest maturation rate of cow oocyte.

**Key Words:** Oocyte, Maturation, *In vitro*, Hormone, PMSG

## ABSTRAK

UDIN, Z., JASWANDI, T. AFRIANI dan LEONARDO E. 2007. Penggunaan pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) dalam pematangan *in vitro* oosit sapi. *JITV* 12(1): 55-59.

Telah diketahui bahwa penambahan hormon dalam medium sangat membantu untuk pematangan oosit *in vitro*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dosis PMSG yang terbaik ditambahkan dalam medium pematangan terhadap persentase oosit yang matang dan tingkat perkembangan inti oosit *in vitro*. Ovarium sapi yang dikoleksi dari Rumah Potong Hewan, kemudian oosit dari ovarium tersebut dikoleksi dengan cara *slicing* setelah dicuci dengan medium PBS. Medium pematangan oosit digunakan TCM-199 yang ditambahkan PMSG dengan dosis 0 mg/ml; 10 mg/ml dan 20 mg/ml sebagai perlakuan dengan 5 ulangan. Oosit yang berkualitas A dan B diinkubasi pada temperatur 38°C selama 24 jam untuk mengevaluasi tingkat perkembangan inti oosit. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan uji lanjut DMRT. Hasil penelitian menunjukkan dosis PMSG berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap perkembangan inti oosit dan persentase oosit yang matang *in vitro*. Perkembangan inti oosit pada tahap GV masing-masing 38,33; 12,64 dan 9,64% untuk dosis 0, 10 dan 20 mg/ml. Tidak ada perkembangan inti oosit pada tahap GVBD. Perkembangan inti oosit pada tahap M-I berturut-turut 7,64; 20,2 dan 22,0%, sedangkan pada tahap M-II adalah 16,32%; 48,10% dan 35,34 mg/ml masing-masing untuk perlakuan penambahan PMSG 0, 10 dan 20 mg/ml. Dapat disimpulkan bahwa penambahan PMSG 10 mg/ml dalam medium maturasi adalah yang terbaik dalam penelitian ini.

**Kata Kunci:** *In vitro*, Oosit sapi, PMSG, Medium

## PENDAHULUAN

Fertilisasi *in vitro* (IVF) merupakan teknologi yang memproduksi embrio dalam jumlah banyak dan relatif murah. Perkembangan IVF telah semakin meluas dengan menggunakan materi, baik dari sapi yang masih hidup maupun yang sudah dipotong. Ovarium sapi yang berasal dari Rumah Potong Hewan merupakan sumber oosit yang murah dan mampu menyediakan oosit dalam jumlah yang banyak. Namun demikian belum semua potensi ovarium dapat dimanfaatkan karena daya hidup oosit yang terbatas dan medium yang digunakan dalam

pematangan oosit *in vitro* masih belum dapat menghasilkan angka pematangan oosit yang optimal. Teknologi fertilisasi *in vitro* dapat menjadi alternatif untuk produksi embrio dalam jumlah banyak. Produksi embrio *in vitro* telah banyak dilakukan pada sapi (TROUNSON *et al.*, 1994).

Pematangan oosit *in vitro* merupakan rangkaian kegiatan teknologi fertilisasi *in vitro*. Medium yang digunakan untuk pematangan oosit *in vitro* umumnya ditambahkan dengan FSH dan LH. Hasil penelitian yang dilakukan oleh TOTEY *et al.* (1993) dengan menggunakan hormon FSH (0,5 µg/ml), LH (5 µg/ml)

dan estradiol (1 µg/ml) yang ditambahkan serum 10% didapatkan angka pematangan oosit meningkat dibandingkan dengan medium yang tidak ditambahkan hormon, tetapi diantara ketiga hormon angka kematangan oosit tidak berbeda nyata. Ditambahkan oleh LEE dan FUKUI (1996) melakukan pematangan 30 - 40 oosit di dalam 100 ml TCM-199 yang ditambah dengan FSH dan LH. Selanjutnya CHOI *et al.* (2001) menambahkan beberapa dosis FSH dan LH dapat meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus, tetapi tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap angka blastosis.

Penggunaan PMSG yang mempunyai fungsi sama dengan FSH merupakan alternatif untuk ditambahkan dalam medium pematangan oosit *in vitro*. PMSG ini merupakan hormon gonadotropin yang relatif lebih murah dan mudah didapatkan. Upaya meningkatkan keberhasilan pematangan oosit *in vitro* dewasa ini terus disempurnakan dengan penambahan berbagai hormon maupun *growth* faktor pada medium TCM-199. Pada penelitian ini digunakan medium yang tidak ditambah hormon dan medium yang ditambah hormon PMSG dengan dosis yang berbeda untuk mendapatkan alternatif medium pematangan oosit yang optimal.

Untuk mengetahui dosis PMSG yang terbaik dalam proses pematangan oosit sapi, maka pada penelitian ini dilakukan penambahan PMSG dalam medium TCM-199 terhadap tingkat perkembangan inti oosit *in vitro*.

## MATERI DAN METODE

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan sejumlah 22 pasang. Sementara itu, medium yang digunakan untuk koleksi ovarium dan oosit adalah NaCl fisiologis dan *phosphate buffer solution* (PBS). Untuk pematangan oosit digunakan larutan TCM-199 yang ditambahkan dengan PMSG. Jumlah oosit yang digunakan pada penelitian ini adalah 300 oosit yang berkualitas A dan B. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fisiologi Reproduksi Ternak/AI Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang.

Koleksi ovarium dari Rumah Potong Hewan dibawa dengan termos yang berisi larutan NaCl fisiologis ke laboratorium. Kemudian di laboratorium ovarium dibersihkan dari sisa lemak dan dicuci dengan NaCl fisiologis.

Koleksi oosit dilakukan dengan metoda *slicing* dengan medium dasar PBS yang telah disuplementasi dengan serum 5%. Oosit yang dikoleksi dicuci dengan medium PBS dengan 5% serum sapi sebanyak 3 kali dan selanjutnya kualitas oosit ditentukan berdasarkan kriteria yang dikemukakan oleh LOOS *et al.* (1989). Oosit yang digunakan pada penelitian ini adalah yang berkualitas A dan B yaitu yang dikelilingi oleh 4 - 5 lapisan sel kumulus. Ditambahkan oleh MOSTAFIZUR *et*

*al.* (2003) bahwa oosit kualitas A dan B didapatkan pada folikel yang berdiameter 2 - 6 mm.

Media dasar untuk koleksi oosit digunakan PBS yang ditambahkan dengan serum sapi 5% dan media untuk pematangan ditambahkan 10% serum sapi dalam media TCM-199. Medium pematangan (TCM-199) oosit *in vitro* ditambahkan dengan 3 dosis PMSG sebagai perlakuan dan 5 ulangan. Dosis PMSG terdiri dari: Perlakuan A = 0 mg/ml; Perlakuan B = 10 mg/ml; Perlakuan C = 20 mg/ml. Selanjutnya oosit dicuci dengan medium TCM-199 sebanyak 3x, disedot/dimasukkan ke dalam straw sebanyak 20 oosit dalam 100 µl medium TCM-199 untuk setiap ulangan. Jumlah oosit untuk setiap perlakuan berjumlah 100 oosit. Kemudian diinkubasi pada temperatur 38°C selama 24 jam. HINRICH *et al.* (1993) melaporkan bahwa angka kematangan lebih tinggi didapatkan pada lama inkubasi 24 jam untuk oosit yang mempunyai kumulus lengkap. Ditambahkan oleh GORDON (1994) bahwa perkembangan inti oosit selama pematangan *in vitro* fase Metafase-II (M-II) dicapai pada 18-24 jam inkubasi.

Evaluasi pematangan oosit dilakukan dengan teknik pewarnaan dan fiksasi untuk mengetahui tingkat kematangan inti oosit sapi setelah inkubasi. Pewarnaan oosit dengan menggunakan aceto-orcein dilakukan selama 15 menit, dan sisa-sisa pewarnaan dicuci dengan larutan gliserol asetal. Tingkat kematangan inti oosit diamati di bawah mikroskop.

Peubah yang diamati adalah tingkat perkembangan inti oosit yang mencakup tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), Metafase-I (M-I) dan Metafase-II (M-II). Analisis data dilakukan dengan analisis ragam dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan uji lanjut DMRT menurut (STEEL dan TORRIE, 1993).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Tingkat perkembangan inti oosit

Tingkat perkembangan inti oosit berdasarkan status pematangan oosit *in vitro* pada 3 dosis PMSG dapat dilihat pada Tabel 1.

Persentase tingkat perkembangan inti oosit pada tahap GV yang tertinggi adalah pada perlakuan A (0 mg/ml) yaitu 38,33%, perlakuan B (10 mg/ml) adalah 12,64% dan terendah perlakuan C (20 mg/ml) adalah 9,64%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penambahan hormon PMSG dapat merangsang perkembangan inti oosit, sehingga jumlah oosit yang berhenti perkembangannya hanya sedikit. Hasil analisis statistik menunjukkan dosis PMSG berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap status inti tahap GV. Uji lanjut

**Tabel 1.** Tingkat perkembangan inti oosit sapi pada 3 dosis PMSG

Dosis PMSG	Perkembangan inti oosit (%)			
	Jumlah oosit (n)	GV	GVBD	M-I
0 mg/ml	100	38,33 <sup>a</sup>	0	7,64 <sup>a</sup>
10 mg/ml	100	12,64 <sup>b</sup>	0	20,52 <sup>b</sup>
20 mg/ml	100	9,64 <sup>b</sup>	0	22,00 <sup>b</sup>

Superskript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata ( $P < 0,05$ )

DMRT menunjukkan bahwa dosis PMSG 0 mg/ml berbeda nyata dengan dosis PMSG 10 mg/ml dan 20 mg/ml. Sedangkan antara dosis 10 mg/ml dan 20 mg/ml tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ) terhadap status inti tahap GV. Ini menunjukkan bahwa pada medium TCM-199 yang tidak ditambahkan dengan hormon PMSG, persentase oosit yang tidak mampu melewati tahap GV lebih banyak, walaupun masih ada sejumlah oosit yang lain terus berkembang ketahap berikutnya. Medium yang tidak ditambah dengan PMSG tidak dapat memenuhi kebutuhan akan hormon dan nutrisi untuk tumbuh oosit. Ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh CHOI *et al.* (2001) bahwa penambahan berbagai dosis FSH (0-10  $\mu$ g) dan LH (10-49  $\mu$ g) meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus, tetapi tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap angka blastosis. Selanjutnya DJUITA (2001) yang melakukan pengamatan inti oosit domba sebelum dan sesudah pematangan baik yang dibekukan maupun tanpa pembekuan dengan metoda vitrifikasi melaporkan bahwa 94% oosit berada pada tahap GV dan 6% berada pada tahap GVBD.

Persentase tingkat perkembangan inti oosit pada tahap GVBD untuk ke 3 dosis PMSG tidak tampak. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua oosit tidak ada yang berhenti pada tahap GVBD dan mampu berkembang ke tahap berikutnya tanpa hambatan. Hal ini mungkin disebabkan oleh waktu inkubasi yang digunakan relatif lebih lama yaitu 24 jam, sedangkan tahap ini terjadi pada awal proses pematangan oosit. Ini sesuai dengan hasil penelitian DJATI (1999) bahwa penambahan PMSG dan LH menyebabkan tingkat perkembangan inti oosit pada tahap GV dan GVBD adalah 0%. Ditambahkan oleh XU dan GREVE (1988) bahwa sapi yang mengalami superovulasi, tahap GVBD bisa dicapai pada waktu 6 - 12 jam setelah maturasi. Selanjutnya PAWSHE *et al.* (1994) menyatakan bahwa metafase II yang ditandai dengan keluarnya benda kutub-I (BK-I) terjadi setelah 16 jam dan mencapai 87% setelah 24 jam. Menurut DE SMEDT *et al.* (1992) menyatakan bahwa lama pematangan *in vitro* adalah 24-27 jam.

Persentase tingkat perkembangan inti oosit pada tahap metafase-I (M-I) yang terendah didapatkan pada dosis PMSG 0 mg/ml dan diikuti dosis PMSG 10 mg/ml dan tertinggi pada dosis PMSG 20 mg/ml (Tabel 1). Hasil analisa statistik menunjukkan dosis PMSG berbeda nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap status inti oosit pada tahap Metafase-I (M-I). Uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa PMSG 0 mg/ml berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) dengan dosis PMSG 10 mg/ml dan dosis PMSG 20 mg/ml. Sementara itu, antara dosis 10  $\mu$ g/ml dengan dosis 20  $\mu$ g tidak berbeda nyata ( $P > 0,05$ ). Persentase yang meningkat dari tahap GV ke tahap M-I merupakan suatu penurunan terhadap jumlah perkembangan inti oosit yang dihasilkan pada dosis 10 mg/ml dan menyebabkan berkurangnya persentase oosit yang berkembang sampai tahap akhir atau M-II. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penurunan jumlah oosit sampai pada tahap M-I disebabkan adanya degenerasi oosit. Disamping itu, boleh jadi terkoleksinya oosit dari folikel yang kurang dari 2 mm menyebabkan terhentinya perkembangan inti oosit, sehingga tingkat perkembangan inti oosit hanya sampai pada tahap M-I. Status perkembangan inti oosit pada tahap M-I ini, hampir sama dengan yang dilaporkan oleh HUNTER (1987) yaitu pematangan oosit sapi 14,21% akan berhenti pada tahap M-I. Sementara itu, SEATON (1991) melaporkan bahwa pematangan inti oosit dengan tanpa medium pada tahap metafase-I adalah 13,9%.

#### Persentase oosit matang (tahap M-II) *in vitro*

Persentase oosit yang matang *in vitro* pada 3 dosis PMSG yaitu: 0, 10 dan 20 mg/ml adalah 16,32, 48,10 dan 35,84% secara berturut-turut (Tabel 2). Rataan keseluruhan oosit yang matang *in vitro* pada tahap Metafase - II (M-II) adalah 33,44%.

Hasil penelitian ini menunjukkan persentase oosit matang pada tahap Metafase-II (M-II) yang terendah pada dosis 0 mg/ml dan diikuti pada dosis 20 mg/ml dan tertinggi pada dosis 10 mg/ml. Hasil analisis statistik menunjukkan dosis PMSG berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase oosit yang matang *in vitro*. Uji lanjut DMRT menunjukkan bahwa antara oosit PMSG 0 mg/ml dengan dosis 10 mg/ml berbeda sangat nyata ( $P < 0,01$ ) terhadap persentase oosit matang. Sementara itu, antara dosis 0 mg/ml dengan dosis PMSG 20 mg/ml menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P < 0,05$ ) terhadap oosit matang *in vitro*. Ini menunjukkan bahwa penambahan PMSG akan meningkatkan persentase oosit matang *in vitro* dan penambahan dosis PMSG 10 mg/ml telah mampu meningkatkan aktivitas pematangan inti oosit sampai pada tahap Metafase-II (M-II). Ini sesuai dengan yang disampaikan oleh CHOI *et al.* (2001) bahwa penambahan berbagai dosis FSH (0 - 15  $\mu$ g/ml) dan LH

(10–49 µg/ml) meningkatkan ekspansi sel-sel kumulus dan ekspansi sel-sel kumulus yang maksimal terjadi pada penambahan FSH 1 µg/ml dan LH 1 µg/ml dalam medium. Ditambahkan oleh BAVISTER dan NIWA (1992) bahwa medium yang digunakan dalam pematangan oosit *in vitro* tidak hanya dapat mempengaruhi proporsi oosit yang mencapai M-II atau fertilisasi tetapi juga dapat mempengaruhi perkembangan berikutnya.

**Tabel 2.** Persentase oosit matang (M-II) pada 3 dosis PMSG

Dosis PMSG	Persentase oosit matang (M-II)
0 mg/ml	16,32 <sup>a</sup>
10 mg/ml	48,10 <sup>b</sup>
20 mg/ml	35,84 <sup>c</sup>
Rataan	33,44%

Superskript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ( $P < 0,01$ )

Secara fisiologis PMSG lebih bersifat seperti FSH yang memiliki fungsi merangsang pembentukan dan pertumbuhan folikel, sehingga meningkatkan kadar hormon estrogen di dalam darah. Disamping itu persentase oosit matang *in vitro* juga berasal dari kondisi oosit yang digunakan yaitu masih mempunyai kumulus utuh dan fungsional. Menurut PAWSHE *et al.* (1994) koleksi oosit dari ovarium dengan teknik penyayatan adalah metoda yang sederhana dan efisien, karena dapat memperoleh persentase oosit dengan kumulus kompak yang lebih tinggi. Oosit dengan kumulus yang kompak menghasilkan angka pematangannya tinggi.

Rataan persentase oosit yang matang pada penelitian adalah 33,44% lebih rendah dibandingkan dengan hasil penelitian yang didapatkan JASWADI (2001) pada domba, yakni 40, 59 dan 60% pada suhu 4, 24 dan 35°C secara berturut-turut. Perbedaan ini disebabkan sensitifitas terhadap suhu dari kedua spesies dan suhu transparasi ovarium dari rumah potong hewan. Nilai ini sesuai dengan pendapat GORDON (1994) bahwa terbatasnya daya hidup oosit karena kematian yang segera diikuti oleh perubahan generatif pada ovarium. Perubahan itu akan lebih cepat pada kondisi tubuh (35-38,5°C) daripada suhu yang lebih rendah. Pada penelitian ini suhu transparasi ovarium adalah 27°C atau suhu kamar. Selanjutnya SOLANO *et al.* (1994) melaporkan bahwa oosit yang disimpan secara intra folikuler pada suhu 4°C selama 24 jam masih mempunyai kapabilitas untuk mengalami pematangan dan fertilisasi.

## KESIMPULAN

Tingkat perkembangan inti oosit lebih banyak terhenti pada tahap GV dalam medium yang tidak ditambah hormon PMSG (0 mg/ml). Penambahan PMSG dalam medium pematangan sangat nyata ( $P < 0,05$ ) mempengaruhi persentase perkembangan inti oosit. Penambahan dosis PMSG 10 mg/ml dalam medium pematangan oosit sapi *in vitro* adalah yang terbaik dengan rataan oosit matang *in vitro* pada tingkat perkembangan inti oosit tahap M-II adalah 48,10%.

## DAFTAR PUSTAKA

- BAVISTER, L.R. and K. NIWA. 1992. Ability of *in vitro* maturing bovine oocytes to transform sperm nuclei to metaphase chromosomes. *J. Rep. Fert.* 96: 565-572.
- CHOI, Y.H., E.M. CARNEVELA, G.E. SEIDEL JR. and E.L. SQUIRES. 2001. Effects of gonadotrophin on bovine oocytes matured in TCM-1999. *Theriogenology* 56: 661-670.
- DJATI, M.S. 1999. Pengaruh Suplementasi PMSG dan HCG pada Proses Fertilisasi *In Vitro* dan Kultur Klon dan Embrio Sapi dengan IGF-L. Disertasi. Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor
- DJUITA, I. 2001. Kajian Morphologi dan Fungsi Biologi Oosit Domba setelah Kriopreservasi dengan Metode Vitrofikasi. Disertasi. Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- GORDON, I. 1994. Laboratory Production of Cattle Embryo. Biotechnology in Agriculture Series CAB Int. CAB International. Wallingford, UK.
- HINRICH, K., D.F. KENNEY and R.M. KENNEY. 1993. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicle in the mar. *Theriogenology* 34: 107-112.
- HUNTER, A.G. and MOOR, R.M. 1987. Stage-dependent effect of inhibiting ribonucleic acid and protein synthesis on meiotic maturation of bovine oocyte *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 70: 1646-1651.
- JASWADI, A. BOEDIONO and M.A. SETIADI. 2001. *In vitro* maturation and fertilization of sheep oocyte in absence CO<sub>2</sub>. *Reprod. J.* 1: 56-60.
- LEE, E.S. and Y. FUKUI. 1996. Synergistic effect of alanine and glycine on bovine embryos cultured in chemically defined medium and amino acid uptake by *in vitro* produced define morulae and blastocyst. *Biol. Reprod.* 55: 1383-1389.
- LOOS, DE F., C. VAN FLIET, P. VAN MAURICH and T.H.A.M. KRUIP. 1988. Morphology of mature oocyte. *Gamet. Res.* 24: 897-204.

- MOSTAFIZUR RAHMAN, M.G. P.C. GOSWAMI, M.A.M. YAHIA KHNDOKER, K.M.A. TAREG and S.Z. ALI, 2003. Collection of bovine cumulus- oocyte – complexes (COCs) from slougherhouse ovaries in Bangladesh, *Pakistan J. Biol. Sci.* 24: 2054-2057.
- SOLANO, R., R. DE ARMAS, C.A. PUPO and F.O. CASTRO. 1994. Short term preservation of intra follicular oocytes at 4°C. *Theriogenology* 41: 299.
- SEATON. 1991. Effect of co-culture with follicle shell on cumulus expansion and nuclear maturation porcine oocyte. *Bogor Agric. Univ. J.* 2: 87-91.
- PAWSHE, 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. *Theriogenology.* 42: 117-125.
- STEEL, R.G.D dan TORRIE, J.H. 1993. Prinsip Prosedur Statistik. PT. Gramedia Utama. Jakarta.
- TROUNSON, A., D. PUSHETT, L.J. MACHELLAN, I. LEWIS and GARDNER. 1994. Current status of IVM/IVF of embryos culture in human and farm animal. *Theriogenology* 42: 1153-1171.
- TOTEY, S.M, C.H. PAWSHE and G.P. SINGH. 1993. *in vitro* maturation and fertilization of buffalo oocyte (*Bubalus*): Effect of media, hormone and sera. *Theriogenology* 41: 56-66.
- XU, K.P. and T. GREVE. 1988. A detailed analysis of early event during *in vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. *J. Rep. Fert.* 82: 127-134.