

Dwi Liliek Kusindarta

---

**PENGARUH LAMA MATURASI DAN LAMA INKUBASI FERTILISASI  
TERHADAP ANGKA FERTILITAS OOSIT SAPI PERANAKAN ONGOLE  
SECARA *IN VITRO***

*The Effects of Maturation Time and Duration of Incubation Fertilization on Fertilization Rate  
of Ongole Grade Cattle Oocyte in Vitro*

**Dwi Liliek Kusindarta**

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta  
e-mail: indarta@ugm.ac.id

**ABSTRAK**

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan Ongole (PO) secara *in vitro*. Oosit diaspirasi dari folikel ovarium yang berdiameter 2-6 mm. Oosit dirandom untuk penelitian menggunakan rancangan blok acak sempurna (RCBD), dengan lama maturasi 20, 22 dan 24 jam sebagai blok dan lama inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam sebagai perlakuan. Hasil penelitian menunjukkan angka fertilitas oosit sapi PO dengan lama maturasi 20 jam dan lama inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam masing-masing adalah  $48,86\% \pm 3,88$ ,  $48,08\% \pm 2,22$  dan  $51,96\% \pm 2,27$ . Angka fertilitas oosit sapi PO dengan lama maturasi 22 jam dan lama inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam masing-masing adalah  $50,14\% \pm 4,18$ ,  $51,14\% \pm 4,35$  dan  $52,27\% \pm 2,26$ . Angka fertilitas oosit sapi PO dengan lama maturasi 24 jam dan lama inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam masing-masing adalah  $51,21\% \pm 4,49$ ,  $53,49\% \pm 2,43$  dan  $50,96\% \pm 4,18$ . Tidak ada perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) angka fertilitas antara lama maturasi 20, 22 dan 24 jam dan tidak ada perbedaan yang nyata ( $P > 0,05$ ) angka fertilitas antara lama inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam.

---

Kata kunci: oosit, maturasi, fertilisasi *in vitro*, sapi Ongole

**ABSTRACT**

*The experiment was designed to determine the effect of maturation time and duration of incubation fertilization on fertilization rate in Ongole grade cattle oocytes in vitro. Oocytes were collected from antral follicle (2-6mm). Oocytes were divided into 9 groups with randomized complete block design (RCBD), maturation time 20, 22 and 24 hours as block and duration of incubation fertilization 4, 5 and 6 hours as treatment. The result of the present study showed that fertilization rate of Ongole grade cattle oocytes at 20 hours maturation time and duration of incubation fertilization 4, 5 and 6 hours were  $48.86\% \pm 3.88$ ,  $48.08\% \pm 2.22$  and  $51.96\% \pm 2.27$ , respectively. Fertilization rate at 22 hours maturation time and duration of incubation fertilization 4, 5 and 6 hours were  $50.14\% \pm 4.18$ ,  $51.14\% \pm 4.35$  and  $52.27\% \pm 2.26$ . In addition, fertilization rate at 24 hours maturation time and duration of incubation fertilization 4, 5 and 6 hours were  $51.21\% \pm 4.49$ ,  $53.49\% \pm 2.43$  and  $50.96\% \pm 4.18$ . There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) among maturation time and duration of incubation for 4, 5, and 6 hours.*

---

Keywords: maturation, oocytes, *in vitro* fertilization, Ongole

## PENDAHULUAN

Usaha pemerintah untuk meningkatkan populasi ternak terus dilakukan. Selain dengan mengimpor bibit-bibit unggul, juga dengan upaya meningkatkan pemanfaatan inseminasi buatan yang telah cukup memasyarakat di daerah-daerah serta penerapan teknologi transfer embrio (Rustanto dan Sugiono, 1997). Salah satu kendala dalam program transfer embrio adalah mahalnya biaya untuk mendapatkan embrio melalui sapi donor yang disuperovulasi dan hanya sedikit oosit yang dapat dimanfaatkan dari total oosit yang terdapat dalam satu ovarium (Gordon, 1994).

Untuk dapat difertilisasi oosit harus matur dahulu. Maturasi oosit meliputi maturasi inti dan maturasi sitoplasma. Selama maturasi oosit, struktur kromatin dalam oosit immatur melewati suatu proses penyusunan morfologi yang dimulai pada profase pembelahan meiosis pertama dan berlanjut sampai metafase kedua. Iwanatsu dan Chang *cit.* oleh Vanderhyden dan Armstrong (1989) menyimpulkan bahwa walaupun penetrasi spermatozoa pada oosit dapat terjadi pada beberapa stadium maturasi, tetapi kondensasi kromatin spermatozoa hanya dapat terjadi setelah *germinal vesicle breakdown* (GVBD). Proporsi oosit dengan pronukleus yang terbentuk baik, meningkat bila oosit diinseminasi menjelang atau pada saat penyelesaian akhir pembelahan meiosis pertama. Waktu yang panjang untuk mencapai periode puncak metafase kedua, bervariasi dari 19-22 jam (Goto *et al.*, 1988), 24 jam (Sirard *et al.*, 1988), dan 26 jam (Kato dan Iritani, 1993).

Pada fertilisasi *in vitro* oosit yang digunakan masih lengkap beserta beberapa

lapis sel kumulus oophorus yang jumlahnya bervariasi untuk masing-masing oosit. Untuk dapat memfertilisasi oosit, spermatozoa terkapasitasi harus melewati sel-sel kumulus, menembus zona pelucida dan berfusi dengan oosit. Oosit dengan sel-sel kumulus sedikit bisa dilewati spermatozoa dalam waktu singkat, sementara oosit dengan sel-sel kumulus lebih banyak akan dilewati oleh spermatozoa dalam waktu yang lebih lama untuk mencapai zona pelucida. Akan tetapi, jika waktu inkubasi terlalu lama akan menyebabkan terjadinya polispermi, sehingga perkembangan embrio tidak dapat berlanjut.

Lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi untuk berbagai jenis sapi bervariasi mulai 7-8 jam (Saeki *et al.*, 1991), 5 jam (Saito, 1994) dan 4 jam (Gliedt *et al.*, 1996). Pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan Ongole (PO) secara *in vitro* belum tersedia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi PO secara *in vitro*. Hasil ini diharapkan dapat memberikan sumbangan informasi bagi pengembangan teknologi reproduksi untuk meningkatkan efisiensi biologis hewan yang sudah tidak produktif dari rumah potong hewan.

## MATERI DAN METODE

### Koleksi Ovarium

Ovarium sapi diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) Kota Yogyakarta. Segera sesudah sapi disembelih, ovarium diambil dari rongga abdomen, dipisahkan dari jaringan sekitar, dicuci, dimasukkan ke

dalam larutan NaCl 0,9% yang ditambah dengan penisilin G 100 IU/ml dan streptomisin sulfat 0,1 mg/ml pada suhu 31-34<sup>o</sup> C. Selanjutnya, ovarium dibawa ke laboratorium untuk dilakukan aspirasi oosit.

#### **Maturasi Oosit**

Oosit diaspirasi dari folikel berdiameter 2-6 mm menggunakan jarum 18 G dan siring 5 ml yang berisi medium aspirasi [Dulbecco's Modified PBS (Gibco BRL Product)], penisilin G 100 IU/ml, streptomisin 0,1 mg/ml, fetal bovine serum 3%). Oosit yang digunakan adalah oosit yang mempunyai lebih dari 2-3 lapis sel kumulus dan sitoplasmanya bergranula. Oosit dibagi menjadi 3 kelompok masing-masing untuk lama maturasi 20, 22 dan 24 jam. Selanjutnya, oosit dicuci dan dimaturasi dalam kultur tetes 100 µl medium maturasi [Medium 199 (Gibco BRL Product), fetal bovine serum 5%, penisilin 100 IU/ml, streptomisin 0,1 mg/ml], ditutup dengan minyak mineral, dan diinkubasi pada 39<sup>o</sup> C, CO<sub>2</sub> 5%.

#### **Kapasitasi Spermatozoa**

Spermatozoa diperoleh dari semen beku yang dicairkan dalam penangas air 37<sup>o</sup> C, diencerkan dengan 6 ml medium pencuci semen (medium bracket dan oliphant 50 ml, Na caffein benzoate 0,1942 g, heparin 50 µl), disentrifugasi 1800 rpm selama 5 menit sebanyak 2 kali. Endapan spermatozoa yang diperoleh diencerkan dengan pengencer semen (medium bracket dan oliphant diperkaya dengan 2% BSA), hingga mencapai 12,5X10<sup>6</sup> sel/ml. Seratus mikroliter aliquot suspensi spermatozoa ditutup dengan minyak mineral dan dipreinkubasi 3 jam pada suhu 39<sup>o</sup> C dan CO<sub>2</sub> 5% untuk proses kapasitasi.

#### **Fertilisasi *In Vitro***

Oosit setiap kelompok perlakuan (lama maturasi) dicuci 2 kali menggunakan medium pencuci oosit dan dibagi secara random menjadi 3 kelompok untuk inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam. Oosit tersebut dimasukkan ke dalam aliquot spermatozoa yang telah dipreinkubasi, diinkubasi pada 39<sup>o</sup> C, CO<sub>2</sub> 5% selama 4, 5 dan 6 jam waktu fertilisasi. Setelah masing-masing masa inkubasi fertilisasi, embrio dicuci dengan medium kultur embrio [Medium 199 (Gibco), fetal bovine serum 5%, Natrium piruvat 1 mM, Penisilin 100 IU/ml, Streptomisin 0,1 mg/ml, dan Amphoterasin B (Fungizone, Gibco) 100 µg/ml], kemudian dipindahkan ke dalam 100 µl medium kultur tetes yang dilapisi minyak mineral, dan inkubasi pada 39<sup>o</sup> C, 5% CO<sub>2</sub>. Pengamatan dilakukan tiap 24 jam dan medium kultur diganti tiap 48 jam diamati hingga embrio mencapai 32 sel.

#### **Analisis Data**

Penelitian ini menggunakan rancangan blok acak sempurna (RCBD) dengan blok waktu maturasi 20, 22 dan 24 jam dan perlakuan waktu inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam. Data angka fertilitas diuji dengan analisis varian seperti dijelaskan oleh Madigan (1983). Angka fertilitas adalah jumlah oosit yang membelah ditambah oosit yang tidak membelah tetapi telah mempunyai 2 pronukleus dibagi jumlah oosit yang difertilisasi (Revel *et al.*, 1995). Data perkembangan embrio hingga 32 sel dilaporkan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Pengaruh Lama Maturasi Oosit terhadap Angka Fertilitas**

Rata-rata angka fertilitas oosit sapi PO secara *in vitro* pada berbagai lama maturasi ditunjukkan pada Tabel 1.

mampu memfertilisasi oosit tanpa ada penundaan waktu untuk menyelesaikan kapasitas. Menurut Parrish *et al.* (1988) untuk dapat melakukan fertilisasi oosit, spermatozoa paling tidak harus sudah mengalami 2 perubahan yaitu perubahan pada membran spermatozoa (kapasitas)

Tabel 1. Rata-rata dan simpangan baku angka fertilitas oosit sapi PO secara *in vitro* dengan berbagai lama maturasi dan berbagai lama inkubasi

Lama maturasi	Lama Inkubasi Fertilisasi						Rata-rata (%)
	4 jam		5 jam		6 jam		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
20 jam	47	48,86±3,88	46	48,08±2,22	45	51,96±2,27	49,36±3,95
22 jam	47	50,14±4,18	45	51,14±4,35	46	52,27±2,26	51,46±3,49
24 jam	45	51,21±4,49	45	53,49±2,43	45	50,96±4,18	51,88±3,64
Rata-rata		50,35±3,94		50,90±3,67		51,46±2,90	

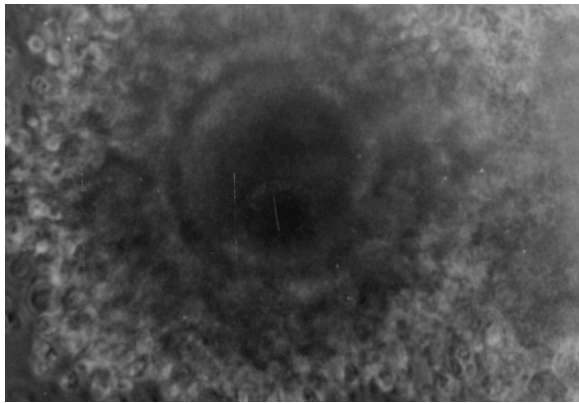
Dari data Tabel 1 terlihat bahwa tidak ada perbedaan yang nyata angka fertilitas antara kelompok maturasi 20, 22 dan 24 jam. Oosit-ooisit yang dimaturasi pada masing-masing waktu tersebut telah matur secara penuh atau telah mencapai stadium metafase meiosis kedua. Sirard *et al.* (1989) mengatakan bahwa oosit sapi yang dimaturasi *in vitro*, maka vesikel germinal tetap ada antara 0-6,6 jam, GVBD terjadi pada 6-6,8 jam, kondensasi kromatin 16,6-18 jam dan metafase kedua pada 18-24 jam. Oosit yang dimaturasi 20 jam telah mencapai stadium metafase kedua, sehingga dapat difertilisasi, sementara yang dimaturasi 24 jam masih dapat dimaturasi. Hal yang sama diungkapkan oleh Hafez (1988), oosit masih dapat difertilisasi hingga 12-24 jam.

Analisis varian tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $P>0,05$ ) angka fertilitas oosit sapi PO pada semua kelompok lama inkubasi. Pada penelitian ini semua kelompok perlakuan menggunakan waktu preinkubasi 3 jam, sehingga diduga spermatozoa sudah mengalami kapasitas dan reaksi akrosom, serta

dan fusi antara membran plasma kepala spermatozoa dan membran akrosom luar (reaksi akrosom). Spermatozoa yang proses kapasitasnya tidak sempurna atau tidak semua spermatozoa mengalami kapasitas akan gagal untuk membuahi oosit atau akan membuahi oosit beberapa jam kemudian (Yanagimachi, 1988). Selain setelah preinkubasi spermatozoa selama 3 jam dan inkubasi 4 jam, spermatozoa dan oosit sudah berkondensasi dan terjadi fusi. Wakayama *et al.* (1995) mengatakan, spermatozoa yang dipreinkubasi 2 jam, menembus zona pelucida 1 jam sesudah inseminasi, kepala spermatozoa dikondensasi 3 jam sesudah inseminasi dan pada 6 jam sesudah inseminasi pronuklei jantan dan betina ditemukan pada kebanyakan oosit yang dipenetrasi.

Angka fertilitas pada penelitian ini adalah berkisar antara 48,08%±2,22 sampai 53,49%±2,43 sebagaimana terlihat pada Tabel 1. Meskipun hasil ini lebih baik dari Budianto (1997), Gustari (1997) dan Karja (1997) yaitu dengan angka fertilitas 25-30% tetapi masih relatif lebih rendah dibanding

hasil penelitian Leidfried-Rudledge *et al.*, (1987) dengan angka fertilitas 73-88%.



Gambar 1. Oosit sapi peranakan Ongole yang diaspirasi dari folikel ovarium sapi sebelum dimaturasi. Oosit dikelilingi sel-sel kumulus oophorus yang kompak dan masih sangat rapat

#### Maturasi Oosit dan Perkembangan Embrio

Gambar 1 menunjukkan morfologi kompleks kumulus oosit sebelum dimaturasi. Sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit masih kompak atau belum meregang. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari ovarium sapi PO yang dipotong di RPH Kota Yogyakarta. Walaupun status reproduksinya tidak diketahui tetapi oosit-oosit tersebut diaspirasi dari folikel berdiameter antara 2-6 mm. Folikel dengan diameter 2 mm mengandung oosit yang sudah mengalami pertumbuhan secara penuh (telah mencapai stadium akhir profase meiosis pertama), sehingga apabila dimaturasi secara *in vitro* dapat melakukan pembelahan meiosis secara spontan. Oosit sapi yang berasal dari folikel dengan diameter kurang dari 1,6 mm belum menyelesaikan fase pertumbuhannya, sehingga belum mampu melakukan pembelahan meiosis pertama (Leidfried-Rutledge *et al.*, 1987), sedangkan oosit pada

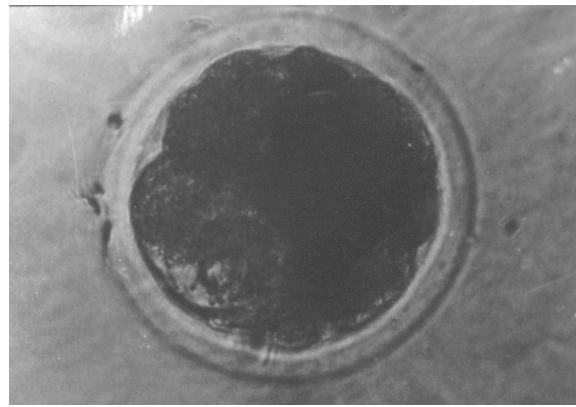
folikel berdiameter 6 mm belum mengalami atresia (Gordon, 1994).

Menurut Edward (1965) oosit kumulus kompleks atau oosit tanpa kumulus sejumlah spesies mamalia diisolasi dari folikel ovarium dan dikultur *in vitro*, akan menjalani meiosis secara spontan dan menjalani GVBD. Pada penelitian ini dipilih oosit yang dikelilingi sel-sel kumulus, karena menurut Vanderhyden dan Armstrong (1989) sel-sel kumulus yang mengelilingi oosit tidak hanya mengatur tingkat maturasi nukleus dan mempertahankan daya hidup oosit tetapi juga penting untuk memacu maturasi sitoplasma. Selama pemasakan oosit secara *in vitro* terjadi perubahan bentuk sel kumulus dan interaksi antara sel-sel folikel dan oosit. Selain itu adanya sel-sel kumulus dan serum pada waktu yang pendek (2 jam) diperlukan untuk pengeluaran badan kutub pertama pada maturasi oosit secara *in vitro* dan juga membantu meningkatkan signifikansi penetrasi oosit oleh spermatozoa. Sel-sel kumulus penting dalam meningkatkan maturasi sitoplasmik yang normal oosit untuk kepentingan pembentukan pronukleus dan kemampuan melanjutkan perkembangan.

Schroeder dan Eppig *cit.* Vanderhyden dan Armstrong (1989) menemukan bahwa oosit dengan sel-sel kumulus mempunyai kemampuan terfertilitasi lebih tinggi dari pada oosit yang dimaturasi tanpa sel-sel kumulus. Hal ini disebabkan adanya sel-sel kumulus yang akan mereduksi tingkat pengerasan zona pelucida selama kultur. Pengerasan zona pelucida akan menurunkan kemampuan terfertilitasinya oosit yang dimaturasi tanpa sel-sel kumulus (DeFlice dan Siracusa, *cit.* Vanderhyden dan Armstrong, 1989).

Vanderhyden dan Armstrong (1989) melaporkan bahwa oosit yang dimaturasi tanpa sel-sel kumulus menunjukkan penurunan pembentukan pronukleus dan frekuensi pembelahan. Sel-sel kumulus tidak hanya mengontrol tingkat maturasi nukleus dan membantu memelihara penetrabilitas oosit, tetapi adanya sel-sel kumulus penting untuk meningkatkan maturasi sitoplasmik secara normal.

Dari hasil penelitian tidak terdapat perbedaan morfologi antara oosit yang dimaturasi selama 20, 22 maupun 24 jam. Pada ketiga kelompok tersebut menunjukkan adanya peregangan kumulus oophorus. Hal ini mengindikasikan bahwa oosit telah mengalami maturasi. Selain ditandai dengan munculnya benda kutub pertama sebagai hasil pembelahan meiosis pertama, secara morfologi diamati adanya peregangan sel-sel kumulus. Peregangan sel-sel kumulus ini terjadi karena adanya stimulasi sintesis asam hialuronik dan serum dalam media dipertahankan di antara sel-sel kumulus (Eppig, 1980). Boediono dan Suzuki (1996) melaporkan bahwa peregangan sel kumulus setelah maturasi secara *in vitro* merupakan salah satu tanda terjadinya maturasi nukleus dan sitoplasma. Peregangan sel kumulus yang mengelilingi oosit bertepatan waktunya dengan terjadinya pembelahan meiosis (Eppig, 1980). Beberapa jam menjelang stimulasi ovulasi, oosit mengalami maturasi nukleus, yang ditandai dengan GVBD, sementara kumulus oophorus mengalami musifikasi dan melekat dalam matrik glikosaminoglikan, suatu proses yang disebut peregangan kumulus. Pada saat ovulasi sel kumulus sudah meregang penuh dan menyelimuti oosit yang secara progresif membelah secara meiosis menjadi metafase II (Eppig, 1980; Eppig dan Downs, 1984).



Gambar 2. Embrio sapi peranakan Ongole stadium 32 sel

Tingkat perkembangan embrio terlihat pada Tabel 2. Rendahnya tingkat perkembangan embrio yang mencapai 32 sel (Gambar 2) kemungkinan karena terjadi blok 8 sel. Kato dan Iritani (1993) menyatakan bahwa pada umumnya perkembangan embrio sapi stadium 1-2 sel secara *in vitro* akan berhenti pada stadium 8-16 sel. Fenomena tersebut dikenal dengan blok 8 sel yang memberikan petunjuk adanya transisi kontrol dari induk ke embrio. Gordon (1994) menyatakan periode kritis dapat terjadinya blok pada pembelahan embrio adalah selama transisi dari stadium 4 sel menjadi 8 sel atau pada stadium 8 sel itu sendiri. Secara *in vivo* sel-sel oviduk mensintesis dan mensekresikan komponen-komponen yang diperlukan untuk perkembangan embrio tahap awal seperti protein (glikoprotein) dan faktor-faktor pertumbuhan. Protein tersebut akan berikatan dengan zona pelucida dan selanjutnya menyatu dengan sitoplasma embrio. Protein dan *messenger ribonucleic acid* (m-RNA) yang tersimpan dalam embrio tersebut penting untuk proses transkripsi yang terjadi selama stadium 4 sel akhir sampai stadium 8 sel awal. Apabila terjadi kegagalan dalam proses transkripsi maka pembelahan embrio akan terhenti atau terjadi blok pada proses pembelahan.

Tabel 2. Tingkat perkembangan embrio sapi PO secara *in vitro* dengan berbagai lama maturasi dan lama inkubasi fertilisasi

Waktu Maturasi	Perkembangan embrio	Waktu fertilisasi		
		4 jam	5 jam	6 jam
20 jam	Total oosit	47	46	45
	Terfertilisasi	22	22	23
	4 sel	10	12	22
	8 sel	8	8	6
	16 sel	4	3	2
	32 sel	0	1	0
22 jam	Total oosit	47	45	46
	Terfertilisasi	24	23	24
	4 sel	10	8	15
	8 sel	5	4	10
	16 sel	4	2	4
	32 sel	2	1	3
24 jam	Total oosit	45	45	45
	Terfertilisasi	23	24	23
	4 sel	19	15	14
	8 sel	4	5	7
	16 sel	2	4	3
	32 sel	0	3	2

Pada penelitian ini, penambahan piruvat pada medium kultur meningkatkan persentase pembelahan hingga 32 sel. Hasil ini lebih tinggi dibanding hasil Budiono (1997), Gustari (1997) dan Karja (1997). McLaren (1982) mengatakan bahwa perkembangan embrio tergantung energi yang disediakan terus menerus oleh lingkungan maternalnya. Setiap stadium embrio mempunyai kemampuan untuk memanfaatkan sumber energi yang berbeda-beda. Embrio satu sel memerlukan piruvat dan oksaloasetat. Embrio dua sel dapat memanfaatkan fosfopiruvat dan laktat, dan setelah mencapai delapan sel telah mampu memanfaatkan glukosa.

Adanya glukosa dalam medium M-199 diduga mengganggu perkembangan embrio awal. Gordon (1994) mengatakan glukosa dalam medium biakan dapat

mengganggu perkembangan embrio awal. Glukosa diduga baru bermanfaat pada perkembangan embrio selanjutnya, untuk mendukung transisi morula ke blastula.

## KESIMPULAN

Tidak ada perbedaan yang nyata pada tingkat fertilitas antara waktu maturasi 20, 22 dan 24 jam serta waktu inkubasi fertilisasi 4, 5 dan 6 jam. Waktu maturasi 20 jam dan inkubasi fertilisasi 4 jam telah cukup untuk maturasi dan fertilisasi oosit sapi PO.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih ditujukan kepada Prof. Dr. drh. Slamet Soebagyo yang telah memberikan arahan selama penelitian dan penulisan serta Yuda Heru Fibrianto dan Diah Tri Widayati atas kerjasamanya selama penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- Budianto, A. 1997. Pengaruh waktu kapasitas terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan Ongole secara *in vitro*. **Tesis**. Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Boediono, A. and T. Suzuki. 1996. In vitro development of Holstein and Japanese Black breeds embryo. **Media Veteriner**. 3(1): 3-15.
- Edward, R.D. 1965. The Spermatozoa. In E. Knobil and J. Neil: **The Physiology of Reproduction**. Reves Press, Ltd., New York.

- Eppig, J.J. 1980. Regulation of cumulus oophorus expansion by mouse oocyte-cumulus cell complex in vitro. **Biol. Reprod.** 22:629-633.
- Eppig, J.J. and S. Downs. 1984. Chemical signal that regulate mammalian oocyte maturation. **Biol. Reprod.** 30:1-11.
- Gliedt, D.W., C.F. Rosenkrans, R.W. Rorie, and J.M., Rakes. 1996. Effect of oocyte maturation length, sperm capacitation time and heparin on bovine embryo development. **J. Dairy Sci.** 79:532-535.
- Gordon, I. 1994. In Vitro maturation (IVM) and in vitro fertilization (IVF) of cattle ova. **Embryo Transfer.** 8:6-10.
- Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakashini, and K. Ogawa. 1988. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. **J. Reprod. Fertil.** 83:253-258.
- Gustari, S. 1997. Pengaruh penambahan glukosa pada medium fertilisasi terhadap angka fertilitas oosit sapi peranakan Ongole secara *in vitro*. **Tesis.** Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hafez, E.S.E. 1988. Folliculogenesis of female reproduction. In E.S.E. Hafez. **Reproduction in Farms Animal.** 5<sup>th</sup> ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Kato, H. and A. Iritani. 1993. In vitro fertilization in cattle. **Molecules Reproduction and Development.** 36:229-231.
- Karja, N.W.K. 1997. Pengaruh penambahan fetal bovine serum pada medium maturasi oosit terhadap perkembangan embrio sapi peranakan ongole secara *in vitro*. **Tesis.** Program Pasca Sarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Leidfried-Rutledge, M.L., E.S. Crester, W.H. Eyestone, D.L. Northey and N.L. First. 1987. Development potential of bovine oocyte matured in vivo or in vitro. **Biol. Reprod.** 36:376-383.
- Madigan, S. 1983. **PC Anova analysis of variance for The IBM PC.** Human System Dinamic, Northidge, California.
- McLaren, A. 1982. The embryo. In C.R. Austin and R.V. Short: **Embryonic and fetal Development.** 2<sup>nd</sup> ed. University Press, USA.
- Parrish, J.J., J. Susko-Parish, M.A., Winer, and N.L. First. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** 38:1171-1180.
- Revel, F., P. Mermillod, N. Peynot, J.P. Renard, and Y. Heyman. 1995. Low development capacity of in vitro matured and fertilized oocyte form calves compared with that of cows. **J. Reprod. Fertil.** 103:115-120.
- Rustanto dan Sugiono. 1997. Lahirnya pedet tabung pertama di Indonesia. **Infovet.** 5:24-25.
- Saeki, K., M. Hoshi, M.L. Leibfried-Rutledge, and N.L. First. 1991. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. **Biol. Reprod.** 44:256-260.
- Saito, N. 1994. **Manual of embryo transfer and in vitro fertilization in cattle.** National Livestock Breeding Center, MAFF, Japan.
- Sirad, M.A., J.J. Parrish, C.D. Ware, M.L. Leidfried-Rutledge, and N.L. First.



1988. The culture of bovine oocyte to obtain developmentally competent embryos. **Biol. Reprod.** 39:546-552.
- Sirard, M.A., H.M. Florman, M.L. Leibfried-Rutledge, F.L. Barnes, M.L. Sims, and N.L. First. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biol. Reprod.** 40:1257-1263.
- Wakayama, T., J. Suto, Y. Matubara, K. Imamura, K. Fukuta, T. Kurohmaru, and Y. Hayashi. 1995. In vitro fertilization and embryo development of Japanese field voles (*Microtus montebelli*). **J. Reprod. Fertil.** 104:63-68.
- Vanderhyden, B.C. and D.T. Armstrong. 1989. Role of the cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. **Biol. Reprod.** 40:720-728.
- Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In E. Knobil and J. Neil: **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, Ltd. New York.