

PENGARUH LAMA MATURASI DAN *LEUKAEMIA INHIBITORY FACTOR* TERHADAP PERKEMBANGAN EMBRIO SAPI SECARA *IN VITRO*

ENDANG TRI MARGAWATI

*Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI,
Jl. Raya Bogor, Cibinong 16911, P.O. Box 422, Bogor 16004*

(Diterima dewan redaksi 15 Nopember 1995)

ABSTRACT

MARGAWATI, E.T. 1996. Effect of maturation periods and leukaemia inhibitory factor on *in vitro* bovine embryo development. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (3): 149-154.

The period of *in vitro* maturation (20 vs 24 hours) with or without supplementation of leukaemia inhibitory factor (LIF) (0, 500, 1000 or 2000 U/ml) was studied on bovine embryo development *in vitro* in a 2 x 4 factorial experiment and designed in a randomized block design. A total of 870 bovine oocytes were used. Besides embryo development, cell numbers of blastocysts were also counted in order to study the quality of the embryos. Oocytes were matured in a modified TCM199 medium containing 10 ug/ml of FSH and LH, 1 ug/ml estradiol, fertilized in TALP and cultured in SOF/AA/BSA medium. There was no interaction between maturation periods and LIF doses on embryo development ($P>0.05$). Maturation periods, however, affected ($P<0.05$) blastocyst rates but did not for cleavage of oocytes and the percentage of oocytes that developed into blastocysts. LIF doses during *in vitro* maturation did not affect embryo development ($P>0.05$). Cell numbers of blastocysts were also not affected by maturation periods and LIF doses ($P<0.05$), however 20 h *in vitro* maturation and supplementation of LIF doses tended to increase the cell numbers. This study suggests that 20 h maturation increases blastocyst rates and that supplementation with LIF during maturation does not affect the quality of embryos produced *in vitro*.

Key words: *in vitro* fertilization, oocyte, cleavage, blastocyst, cell numbers of blastocyst

ABSTRAK

MARGAWATI, E.T. 1996. Pengaruh lama maturasi dan *leukaemia inhibitory factor* terhadap perkembangan embrio sapi secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 1 (3): 149-154.

Lama maturasi (20 berbanding 24jam) dengan atau tanpa penambahan LIF (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml) telah diteliti terhadap perkembangan embrio sapi secara *in vitro* dalam percobaan faktorial 2x4 dan dirancang dalam rancangan acak kelompok. Sebanyak 870 oosit telah digunakan dalam percobaan ini. Selain perkembangan embrio secara *in vitro*, jumlah sel embrio tahap blastosist telah juga dipelajari untuk mengetahui pengaruh LIF terhadap kualitas embrio. Modifikasi TCM 199 dengan penambahan 10 ug/ml FSH, 10 ug/ml LH dan 1 ug/ml estrogen telah digunakan untuk maturasi oosit, medium TALP telah digunakan untuk fertilisasi dan medium SOF/AA/BSA untuk menumbuhkan embrio secara *in vitro*. Tidak terdapat interaksi antara lama maturasi dan dosis LIF terhadap perkembangan embrio ($P>0.05$). Lama maturasi berpengaruh terhadap rataan blastosist ($P<0.05$), namun tidak mempengaruhi persentase oosit yang membelah maupun persentase oosit yang berkembang ke tahap blastosist. Dosis LIF selama maturasi juga tidak berpengaruh ($P>0.05$) terhadap perkembangan embrio. Jumlah sel tahap blastosist juga tidak dipengaruhi ($P>0.05$) oleh lama maturasi maupun dosis LIF, namun maturasi 20 jam dengan penambahan LIF cenderung meningkatkan jumlah sel. Disimpulkan bahwa maturasi oosit selama 20 jam meningkatkan rataan blastosist dan penambahan LIF tidak mempengaruhi kualitas embrio.

Kata kunci: fertilisasi *in vitro*, oosit, pembelahan, blastosist, jumlah sel tahap blastosist

PENDAHULUAN

Studi tentang fertilisasi *in vitro* untuk memproduksi embrio secara laboratoris telah banyak dipelajari oleh para peneliti sebelumnya, di antaranya TERVIT *et al.* (1972); FIRST dan PARRISH (1987); GORDON (1990). Banyak kendala yang dihadapi dalam proses kegiatannya, juga disadari bahwa produksi embrio hasil *in vitro* ini masih rendah. Beberapa usaha untuk meningkatkan produksi telah banyak dilakukan, di antaranya akhir-

akhir ini menggunakan berbagai faktor penumbuh seperti *epidermal growth factor* (EGF), *insulin-like growth factor* (IGF), *transforming growth factor* (TGF), *fibroblast growth factor* (FGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF). Sementara itu, penggunaan *leukaemia inhibitory factor* (LIF) belum banyak dilakukan. Penggunaan LIF telah dipelajari untuk perkembangan embrio domba (FRY *et al.*, 1992a) dan embrio sapi (FRY *et al.*, 1992b; FUKUI dan MATSUYAMA, 1994). Penelitian sebelumnya masih mengonsentrasikan penggunaan LIF

atau faktor penumbuh lainnya selama waktu perkembangan embrio, namun belum banyak yang menambahkan faktor penumbuh untuk maturasi oosit dan mengombinasikannya dengan faktor waktu maturasi.

Lama maturasi yang tepat akan menghasilkan tidak saja jumlah oosit masak, tetapi secara keseluruhan juga dapat mengefisienkan kegiatan produksi embrio secara *in vitro*. Terlalu lama waktu maturasi dapat menghasilkan oosit yang terlalu tua dan mengakibatkan terganggunya proses fertilisasi *in vitro* (CHIAN *et al.*, 1992) dan selanjutnya mempengaruhi perkembangan embrio. Hasil studi MARGAWATI (1995) menunjukkan bahwa lama maturasi dari 18 sampai 22 jam dengan penambahan LIF dapat meningkatkan jumlah oosit masak. Demikian pula penambahan hormon baik gonadotropin maupun estrogen telah dipelajari dan ternyata dapat meningkatkan jumlah oosit yang masak (BAKER *et al.*, 1977).

Dalam penelitian ini telah dipelajari pengaruh lama maturasi dengan atau tanpa penambahan LIF serta penambahan hormon FSH, LH dan estrogen selama waktu maturasi terhadap proporsi jumlah oosit yang berkembang ke tahap blastosist.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dikerjakan di Laboratorium Embriologi AgResearch-Ruakura, Hamilton, Selandia Baru, dari bulan April sampai Juli 1994. Metode dan prosedur fertilisasi *in vitro* yang dikerjakan mengacu pada metode Tervit *et al.* (1972) dengan beberapa perubahan.

Koleksi oosit

Ovarium dikoleksi dari sapi tak teridentifikasi dari Rumah Pemotongan Hewan (RPH) lokal di Hamilton, Selandia Baru dan dibawa ke laboratorium dengan *phosphate buffered saline* (PBS) pada suhu 39°C. Di laboratorium, ovarium segera diproses dan oosit diaspirasi dari folikel berdiameter antara 2-6 mm dengan pompa penyedot (*aspiration pump*) menggunakan jarum berukuran 18 Gauge. Larutan hangat aspirasi H199 + Heparin + 2% *bovine serum albumin* (BSA) telah digunakan untuk koleksi oosit. Hanya oosit yang mempunyai morfologi bagus (dilingkari kompak sel kumulus) dikoleksi, kemudian dicuci 2 kali dengan *Hepes buffered 199* (H199) + 10% *fetal calf serum* (FCS) dan B199 + 10% FCS sebelum dimaturasikan.

Maturasi *in vitro*

Modifikasi *tissue culture medium 199* (TCM 199) atau *bicarbonate buffered 199* (B 199) dengan penambahan 10% FCS, 10 ug/ml *follicle stimulating hormone* (FSH) dan 10 ug/ml *luteinizing hormone* (LH) serta 1 ug/ml estrogen digunakan untuk maturasi oosit. LIF yang telah dipersiapkan ditambahkan ke dalam setiap vial yang berisi medium maturasi sesuai dengan konsentrasinya (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml). Dibuat tetes atau drop maturasi (50 ul/tetes) sesuai dengan grup perlakuan (2 lama maturasi x 4 konsentrasi LIF= 8 grup) di dalam cawan Petri dan ditutup dengan minyak mineral (*mineral oil*) kemudian diekuilibrasikan di dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 39°C dengan kelembaban tinggi (80-90%) paling sedikit 2 jam sebelum digunakan untuk maturasi oosit. Setelah pencucian oosit terakhir, setiap 10 oosit yang terseleksi ditanam ke dalam tetes maturasi kemudian dieramkan di dalam inkubator CO₂ yang sama untuk ekuilibrasikan. Sesuai dengan perlakuan yang diberikan, maturasi dihentikan setelah 20 dan 24 jam.

Fertilisasi *in vitro*

Sperma beku dari pejantan *single Jersey* telah digunakan untuk fertilisasi *in vitro*. Sperma dipersiapkan dengan memisahkan sperma yang mempunyai motilitas tinggi dengan menggunakan *percoll gradient*. 45% larutan *percoll* ditempatkan di atas 90% larutan *percoll*, dan sperma yang telah dicairkan (*thawing*) ditempatkan di atas 45% *percoll* di dalam 15 ml tabung berbentuk kerucut. Sperma dipisahkan dengan cara sentrifugasi 2 kali dengan kecepatan sebesar 2.000 rpm dan 1.500 rpm, masing-masing selama 20 dan 5 menit. Pelet sperma dicuci dengan *Hepes TALP* (*Tyrode's medium with albumin, lactate and pyruvate*) sebelum sentrifugasi ke dua. Setelah sentrifugasi kedua, pelet sperma dicairkan dengan medium fertilisasi. Dengan haemositometer sperma dihitung dan dibuat menjadi konsentrasi 10 x 10⁶ spermatozoit/ml.

Seperti pada maturasi medium, dibuat tetes fertilisasi di dalam cawan Petri dengan volume 30 ul/ml per tetes, ditutup dengan minyak mineral dan diekuilibrasikan di dalam inkubator CO₂ paling sedikit 2 jam sebelum digunakan untuk fertilisasi. Sebelum difertilisasi oosit yang masak dipisahkan menjadi oosit tunggal dari lekatan perkembangan sel kumulus sambil dicuci 2 kali dengan *Hepes TALP* dan medium fertilisasi. Oosit kemudian dialokasikan ke dalam tetes fertilisasi, setiap 5 oosit

dengan volume 10 ul medium fertilisasi per tetes dan ditambahkan 10 ul larutan sperma, sehingga menjadikan konsentrasi akhir 2×10^6 sperma/ml. Tetes fertilisasi ini kemudian dieramkan di dalam inkubator 5% CO₂ pada suhu 39°C dengan kelembaban tinggi selama 24 jam.

Perkembangan embrio *in vitro*

Setelah 24 jam fertilisasi, oosit dibersihkan dari kotoran sel kumulus dan sperma yang melekat dengan 0,1% *hyaluronidase* dan dipusingkan dengan vorteks selama 1-2 menit. Segera oosit dipindahkan ke medium Hepes SOF (*synthetic oviductal fluid*) untuk dicuci. Pencucian kedua dilakukan di dalam tetes kultur yang telah dipersiapkan 2 jam sebelumnya di dalam cawan Petri ditutup dengan minyak mineral. Seperti pada maturasi dan fertilisasi, tetes kultur diekuilibrasikan 2 jam sebelum oosit ditanam di dalam inkubator 5% CO₂, 7% O₂ dan 88% N₂ pada suhu 39°C. Medium kultur yang digunakan adalah SOF/AA/BSA, yaitu campuran dari SOF, asam amino *essential* dan *non-essential* (AA) serta BSA bebas asam lemak. Setiap 5 oosit dikulturkan ke dalam 30 ul tetes kultur dan dieramkan di dalam inkubator 5% CO₂, 7% O₂ dan 88% N₂ pada suhu 39°C dan kelembaban tinggi sampai tahap perkembangan blastosist. Medium kultur ini diganti setiap 48 jam untuk memungkinkan embrio berkembang lebih lanjut. Pengamatan pembelahan dilakukan pada hari ke-2 setelah fertilisasi dan embrio tahap blastosist akan dipanen pada hari ke-7.

Pewarnaan Giemsa

Untuk penghitungan sel tahap blastosist, perlu dibuat preparat sel pada gelas objek (*slide glass*). Embrio tahap blastosist yang habis dipanen dicuci dengan Hepes SOF, kemudian ditransfer ke dalam larutan 0,9% Na-citrat selama 15-20 menit. Satu per satu embrio dipindahkan ke dalam larutan fiksasi (campuran etanol, asam asetat dan air) dingin dan segera di cetak di atas gelas objek dan dibiarkan kering udara kemudian diwarnai dengan 4% larutan Giemsa selama 15 menit. Gelas objek dicuci dengan air kran, setelah kering siap dihitung jumlah selnya di bawah mikroskop.

Konsentrasi LIF

LIF yang digunakan adalah *recombinant human LIF* (rh-LIF) yang dibeli dari AMRAD Corporation Ltd, Australia. Setiap vial mempunyai konsentrasi 5×10^5 unit, dibuat konsentrasi 1×10^6 unit/ml dengan pelarut

PBS. Sumber konsentrasi LIF ini digunakan untuk membuat konsentrasi LIF: 0, 500, 1000 dan 2000 Unit/ml dalam medium maturasi.

Analisis statistik

Lama maturasi (20 berbanding 24 jam) sebagai faktor pertama dikombinasikan dengan dosis LIF (0, 500, 100 dan 2000 U/ml) sebagai faktor kedua dalam percobaan 2×4 faktorial dan dirancang dengan rancangan acak kelompok. Dengan demikian terdapat 8 grup perlakuan, masing-masing diulang sebanyak 5 kali. Sebanyak 870 oosit telah digunakan dalam penelitian ini. Data dianalisis dengan prosedur *general linear models* (GLM) untuk ANOVA (analisis sidik ragam), menggunakan program *statistical analysis system* (SAS), 1985. Data pembelahan oosit sampai berkembang ke tahap blastosist sebelum diolah dengan GLM, perlu ditransformasi terlebih dahulu dengan transformasi sudut (\arcsin akar Y atau proporsi) atau kebalikan sinus (\sin^{-1} akar Y atau proporsi) menurut SNEDECOR and COCHRAN (1980). Untuk memudahkan interpretasi, hasil analisis data telah diretransformasi dengan $(\sin^{-1} X)^2$ sebelum disajikan dalam tabel. Data penghitungan jumlah sel langsung diolah dengan GLM. Perbedaan antar perlakuan diuji dengan *Student's t-test* pada taraf 1 - 5%. Parameter pengamatan, meliputi:

1. Persentase pembelahan = $\frac{\text{oosit membelah}}{\text{jumlah oosit}} \times 100\%$
2. Persentase blastosist = $\frac{\text{jumlah blastosist}}{\text{jumlah oosit}} \times 100\%$
3. Rataan blastosist = $\frac{\text{jumlah blastosist}}{\text{oosit membelah}} \times 100\%$
4. Jumlah sel tahap blastosist yang dihitung dengan alat penghitung tangan (*hand counter*) di bawah *inverted microscope* dengan pembesaran 300 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan embrio

Persentase oosit yang membelah dan berkembang ke tahap blastosist setelah 20 versus 24 jam maturasi *in vitro* pada berbagai dosis LIF (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml) di sajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 tampak bahwa tidak terdapat interaksi ($P > 0,05$) antara lama maturasi dan berbagai dosis LIF selama maturasi oosit

Tabel 1. Pengaruh lama maturasi dan LIF selama maturasi *in vitro* pada perkembangan embrio (Mean \pm SEM)

LIF dalam maturasi medium (U/ml)	Jumlah oosit	Perkembangan embrio (%)		
		Pembelahan (dari oosit)	Blastosist (dari oosit)	Rataan blst (dari pembelahan)
20 jam IVM				
0	112	77,78 \pm 4,04	20,84 \pm 3,33	27,14 \pm 3,53
500	110	80,14 \pm 4,04	21,02 \pm 3,33	26,79 \pm 3,53
1000	111	80,40 \pm 4,04	25,34 \pm 3,33	32,40 \pm 3,53
2000	110	77,04 \pm 4,04	17,15 \pm 3,33	22,80 \pm 3,53
24 jam IVM				
0	96	77,99 \pm 4,04	12,00 \pm 3,33	15,20 \pm 3,53
500	110	88,70 \pm 4,04	20,52 \pm 3,33	23,20 \pm 3,53
1000	112	86,24 \pm 4,04	19,23 \pm 3,33	22,47 \pm 3,53
2000	109	76,32 \pm 4,04	14,24 \pm 3,33	19,33 \pm 3,53

Mean = Rataan; SEM= Standard error for the means= simpangan baku rataannya; IVM= *In vitro* maturation. Tidak berbeda ($P>0,05$) antar perlakuan yang diberikan terhadap % oosit yang membelah, % blastosist dan rataan blastosist; blst= blastosist

in vitro pada persentase kejadian oosit yang membelah dan pembentukan blastosist setelah fertilisasi dan kultur embrio secara *in vitro*. Meskipun interaksi antar perlakuan tidak nampak, namun ada suatu kecenderungan bahwa lama maturasi oosit 20 dan 24 jam dengan penambahan LIF sebesar 500 dan 1000 U/ml selama waktu maturasi dapat meningkatkan persentase oosit yang membelah pada hari ke-2 setelah fertilisasi *in vitro* (80,14%; 80,40% dan 88,70%; 86,24%) dan juga meningkatkan pembentukan blastosist dari oosit yang membelah (rataan blastosist= 26,79%; 32,40% dan 23,20%; 22,47%). Diperkirakan ada peran positif dari LIF selama proses maturasi sebelum oosit dibuahi. Dugaan ini juga ditunjang oleh studi sebelumnya (MARGAWATI, 1995) bahwa faktor penumbuh LIF yang selama ini belum terungkap perannya dalam maturasi *in vitro* telah menunjukkan dapat meningkatkan jumlah oosit yang masak dari oosit muda (*immature oocytes*) yang dikoleksi dari RPH dan tersedianya oosit yang masak ini memungkinkan terjadinya fertilisasi *in vitro*. Seperti diungkapkan oleh FIRST dan PARRISH (1987), keberhasilan fertilisasi *in vitro* sangat tergantung pada ketersediaan sperma yang masak atau terkapasitasi dan juga oosit yang masak.

Secara keseluruhan, maturasi oosit selama 20 jam baik dengan maupun tanpa penambahan LIF menunjukkan persentase yang lebih tinggi baik pada oosit yang membelah maupun yang terus berkembang ke tahap blastosist daripada maturasi selama 24 jam dengan atau tanpa LIF.

Meskipun tidak terdapat interaksi di antara perlakuan yang diberikan, namun lama maturasi berpengaruh nyata

($P<0,05$) terhadap rataan blastosist (Tabel 2). Dari Tabel ini dapat dilihat bahwa maturasi oosit yang singkat (20 jam) menghasilkan rataan blastosist lebih tinggi (27,22 \pm 1,70) daripada maturasi selama 24 jam (19,95 \pm 1,70). Hasil serupa juga dilaporkan oleh DOMINKO and FIRST (1992) bahwa maturasi yang lebih lama (24 jam) baik dengan penambahan LH (5g/ml) maupun SH (25g/ml) menghasilkan proporsi rataan blastosist yang lebih rendah (10% dan 12%) daripada oosit yang dimaturasi selama 16 jam (47% dan 34%) atau pada 20 jam maturasi (35% dan 30%). Dalam studi ini, maturasi selama 24 jam diperkirakan mengakibatkan oosit menjadi tua atau kelewat masak. Lebih lanjut dijelaskan oleh CHIAN *et al.* (1992) bahwa oosit yang tua menunjukkan adanya peningkatan kejadian *polyspermic fertilization* dan selanjutnya pembelahan menjadi 4 sampai 16-sel akan terganggu.

Dari perhitungan statistik tidak diperoleh pengaruh yang nyata ($P>0,05$) dari dosis LIF yang ditambahkan (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml) selama proses maturasi terhadap jumlah oosit yang membelah dan berkembang ke tahap blastosist.

Jumlah sel tahap blastosist

Jumlah sel tahap blastosist sesudah maturasi 20 berbanding 24 jam pada berbagai dosis LIF (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml) disajikan pada Tabel 3. Seperti halnya pada perkembangan embrio, data pada Tabel 3 menunjukkan tidak terdapat interaksi ($P>0,05$) antara lama maturasi dan dosis LIF selama waktu maturasi oosit pada jumlah sel tahap blastosist yang dihasilkan sesudah fer-

Tabel 2. Perkembangan embrio sapi dari 20 dibanding 24 jam maturasi setelah fertilisasi dan kultur *in vitro* (Mean \pm SEM)

Lama maturasi (jam)	Jumlah oosit	Perkembangan embrio (%)		
		Pembelahan (dari oosit)	Blastosist (dari oosit)	Rataan blst. (dari pembelahan)
20	443	78,86 \pm 1,97	21,01 \pm 1,62	27,22 \pm 1,70 ^a
24	427	82,63 \pm 1,97	16,34 \pm 1,62	19,95 \pm 1,70 ^b

Mean= Rataan; SEM= Standard error for the means (simpangan baku rataannya)
^{a,b} = berbeda nyata (P<0,05) antar perlakuan terhadap rataan blastosist; blst= blastosist

Tabel 3. Pengaruh lama maturasi dan LIF selama maturasi *in vitro* terhadap jumlah sel embrio tahap blastosist setelah kultur embrio *in vitro* (Mean \pm SEM)

Lama maturasi (jam)	Dosis LIF dalam maturasi medium (U/ml)			
	0	500	1.000	2.000
20	123,20 \pm 8,94 (n=24)	131,89 \pm 9,42 (n=29)	141,82 \pm 9,70 (n=22)	131,59 \pm 9,70 (n=26)
24	118,12 \pm 14,1 (n=8)	115,80 \pm 8,94 (n=20)	128,82 \pm 9,70 (n=17)	127,75 \pm 11,5 (n=12)

Mean= Rataan; SEM= Standard error for the means (simpangan baku rataannya) tidak berbeda nyata antar perlakuan (P>0,05) terhadap jumlah sel embrio tahap blastosist

tilisasi dan kultur embrio secara *in vitro*. Meskipun demikian data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa jumlah sel embrio tahap blastosist cenderung lebih tinggi pada embrio yang berkembang dari oosit yang dimaturation selama 20 jam baik dengan atau tanpa penambahan LIF. Demikian juga hasil analisis menunjukkan tidak terdapat perbedaan (P>0,05) baik di antara perlakuan lama maturasi (20 dibanding 24 jam) maupun dosis LIF selama waktu maturasi (0, 500, 1000 dan 2000 U/ml) pada jumlah sel embrio tahap blastosist setelah fertilisasi dan kultur embrio secara *in vitro*. Maturasi oosit selama 20 jam dengan penambahan 1000 U/ml LIF menghasilkan jumlah sel embrio tahap blastosist yang paling tinggi (142 sel). Secara keseluruhan jumlah sel hasil penelitian ini masih lebih tinggi bila dibandingkan dengan rataan jumlah sel embrio tahap lanjut blastosist (*expanded* dan *hatched blastocyst*) tanpa penambahan faktor penumbuh, masing-masing berjumlah 43 dan 80 sel (IWASAKI and NAKAHARA, 1990). Studi lain menguji berbagai faktor penumbuh pada jumlah sel tahap blastosist menunjukkan bahwa beberapa faktor penumbuh dapat meningkatkan persentase embrio yang berkembang baik

menjadi morula maupun blastosist tanpa meningkatkan jumlah selnya (YANG *et al.*, 1993).

KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa pengaruh lama maturasi oosit secara *in vitro* dan penambahan LIF selama maturasi oosit tidak berpengaruh terhadap perolehan oosit baik yang membelah maupun yang terus berkembang ke tahap blastosist. Meskipun demikian maturasi oosit selama 20 jam telah memberi perolehan embrio yang lebih banyak daripada maturasi selama 24 jam. Jumlah sel embrio tahap blastosist dengan perlakuan LIF terbukti masih menunjukkan jumlah sel yang tinggi.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan untuk mengefisienkan waktu dalam memproduksi embrio secara *in vitro*, waktu maturasi oosit dapat diturunkan dari 24 jam menjadi 20 jam. Faktor penumbuh LIF yang ditambahkan selama maturasi oosit dapat membantu

mengembangkan oosit yang membelah dan berkembang ke tahap blastosist tanpa menurunkan kualitasnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan sebagian dari thesis Master penulis di Massey University, Selandia Baru. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ms. Anne Pugh dan Dr. H.R. Tervit dari Embryology Laboratory, AgResearch-Ruakura, Hamilton, Selandia Baru dan Prof. M.F. McDonald dari Department of Animal Science of Massey University, Selandia Baru atas saran dan bimbingannya selama penelitian berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- BAKER, T.G., J.S.G. BIGGS, and R.H.F. HUNTER. 1977. Control of oocyte maturation in mammals. *In: James, V.H.T., ed. Endocrinology. Excerpta Medica, Amsterdam* 1: 351-361.
- CHIAN, R.C., H. NAKAHARA, K. NIWA, and H. FUNAHASHI. 1992. Fertilization and early cleavage *in vitro* of ageing bovine oocytes after maturation in culture. *Theriogenology* 37: 665-672.
- DOMINKO, T. and N.L. FIRST. 1992. Kinetics of bovine oocyte maturation allows selection for developmental competence and is affected by gonadotropins. *Theriogenology* 37: 203.(Abstr.).
- FIRST, N.L. and J.J. PARRISH. 1987. *In vitro* fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 34: 151-165.
- FRY, R.C., P.A. BATT, R.J. FAIRLOUGH, and R.A. PARR. 1992a. Human leukaemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol. Reprod.* 46: 470-474.
- FRY, R.C., T.L. PURDON, T.J. SQUIRES, and R.A. PARR. 1992b. The development of bovine embryos cultured in media containing hLIF. *Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol.* 24: 92. (Abstr.).
- FUKUI, Y. and K. MATSUYAMA. 1994. Development of *in vitro* matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukaemia inhibitory factor. *Theriogenology* 42: 663-673.
- GORDON, I. 1990. Laboratory production of cattle embryos. *Proceedings of 3rd Symposium on Advance Topics in Animal Reproduction*. pp. 63-87.
- IWASAKI, S. and T. NAKAHARA. 1990. Cell number and incidence of chromosomal anomalies in bovine blastocysts fertilized *in vitro* followed by culture *in vitro* or *in vivo* in rabbit oviduct. *Theriogenology* 33: 669-675.
- MARGAWATI, E.T. 1995. The Effect of Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) on Bovine Embryo Development *in vitro*. Master Thesis, Massey University, New Zealand.
- SNEDECOR, G.W. and W.G. COCHRAN. 1980. *Statistical Methods*. 7th ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A.
- TERVIT, H.R., D.G. WHITTINGHAM, and E.A. ROWSON. 1972. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. *J. Reprod. Fertil.* 30: 493-497.
- YANG, B.K., X. YANG, and R.H. FOOTE. 1993. Effect of growth factors on morula and blastocyst development of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized bovine oocytes. *Theriogenology* 40: 521-530.