



Pengaruh Medium Kultur Bebas Serum terhadap Perkembangan Preimplantasi Embrio Mencit *in vitro*

Effect of Serum Free Media Culture on Preimplantation Development of Mouse Embryos in vitro

K. Eriani¹, Sunarti¹, M. Nasir¹, I. Djuwita²

¹Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Syiah Kuala University, Darussalam, Banda Aceh

²Faculty of Veterinarian, Institute of Agriculture of Bogor (IPB) Bogor

KEYWORDS reproductive biotechnology; developmental biology; MEM; *in vitro* development

ABSTRACT The use of serum in a culture medium is a common practice in the study of mouse embryo development *in vitro*. However, the role of unknown factors in serum influencing the embryo development has been difficult to determine. The aim of this study was to investigate the effect of amino acid in serum free medium on *in vitro* development of mouse embryo. This study was conducted in the following ways: (1) medium M16 supplemented with 0.3% BSA, (2) medium M16 supplemented with 2% *v/v* MEM, and (3) medium M16 supplemented with 2% *v/v* MEM and 0.1 mmol of glutamine. The embryos were collected in 3 stage of development: zygote (day-1), morula (day-3) and compacted morula (day-4). The results indicated that supplementation of amino acid into M16 culture medium could replace the role of BSA aims at supporting the developmental potency of mouse embryos *in vitro*.

Penelitian di bidang kultur *in vitro*, memiliki peranan yang sangat besar dalam menentukan kemajuan teknologi kultur *in vitro*. Hal ini seiring dengan kebutuhan akan embrio untuk kepentingan penerapan maupun penelitian di bidang bioteknologi reproduksi dan biologi perkembangan.

Sel embrio dapat tumbuh secara *in vitro* di dalam medium kultur yang diberi tambahan serum seperti serum yang berasal dari fetus atau induk. Namun demikian, untuk mempelajari fenomena pertumbuhan dan perkembangan embrio, unsur yang belum diketahui (*unknown factor*) yang terkandung dalam serum dapat mengaburkan fenomena yang ingin diketahui, sehingga sulit untuk menentukan faktor yang berperan di dalam pertumbuhan. Untuk mengetahui komposisi bahan kimia yang ditambahkan secara pasti, maka digunakan medium kultur tanpa penambahan serum. Kebutuhan nutrisi dasar seperti protein yang biasanya terpenuhi oleh serum diganti dengan menambahkan asam amino yang diketahui secara pasti. Medium tersebut dikenal dengan *chemically defined medium*.

Pada pertumbuhan embrio mamalia secara *in vitro*, kendala yang paling menonjol adalah terjadinya hambatan perkembangan pada awal perkembangan (Nasr-Esfahani dan Johnson, 1991; Miyoshi *et al.*, 1994). Kendala tersebut terutama disebabkan oleh dua faktor, yaitu dihasilkannya oksigen radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂) dan super oksida

(O²⁻) (Nasr-Esfahani dan Johnson, 1991; Nasr-Esfahani *et al.*, 1992), serta hambatan pada proses glikolisis sehingga embrio tidak dapat secara optimal memanfaatkan glukosa sebagai sumber energi (Seshagiri dan Bavister, 1991). Untuk itu, perlu adanya penambahan bahan yang dapat bertindak sebagai agen pengikat (*chelating agent*) untuk meniadakan oksigen radikal serta sumber energi selain glukosa.

Aurich dan Han (1994) menyatakan bahwa asam amino sangat dibutuhkan dalam jumlah tinggi pada tahap awal perkembangan embrio. Brinster (1973) mengatakan bahwa sistein, triptofan, fenilalanin, lisin, arginin dan valin esensial untuk pembelahan awal embrio kelinci. Demikian juga Chatot *et al.* (1989) mencobakan glutamin ke dalam medium kultur yang masih disuplementasikan BSA, sehingga faktor penyebab hilangnya hambatan perkembangan pada tahap 2-sel tidak dapat diketahui. Oleh karena itu di dalam penelitian ini dilakukan penambahan asam amino dan menghilangkan serum (BSA) yang diharapkan dapat mengatasi kedua permasalahan tersebut.

Correspondence:

Dr. Kartini Eriani, M.Si, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Science, Syiah Kuala University, Darussalam, Banda Aceh, Jl. Syeh Abdurrauf No.3 Darussalam NAD 23111. Email: kartini.eriani@gmail.com, kartini24@yahoo.com

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan asam amino esensial minimum dengan dan tanpa asam amino non esensial glutamin ke dalam medium kultur M16 bebas serum terhadap perkembangan embrio mencit secara *in vitro*.

BAHAN DAN CARA KERJA

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit (*Mus musculus albinos*) strain DPY betina berumur dua bulan dan mencit jantan dari strain yang sama berumur tiga sampai empat bulan.

Penelitian dirancang menggunakan rancangan acak lengkap dengan tiga perlakuan, yaitu: M16 + BSA, M16 + MEM, dan M16 + MEM + Glutamin dalam tiga ulangan. Data perkembangan embrio dianalisis menggunakan sidik ragam (ANOVA) dan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1989).

Pembuatan medium

Medium yang digunakan untuk koleksi dan pencucian embrio adalah medium phosphate buffer saline (PBS, Sigma, USA) yang diberi tambahan 0.3% bovine serum albumin (BSA, Sigma, USA), penisilin dan streptomisin. Medium dasar yang digunakan adalah medium M16 yang dimodifikasi dengan penambahan 1.0 mg polivinilalkohol ml⁻¹ (PVA), penisilin dan streptomisin. Sebagai perlakuan pada medium dasar dilakukan penambahan: (1) 2% (v/v) minimal essential medium (MEM) essential amino acid solution (EAA, Gibco, USA), (2) medium (1) + 0.1 mmol glutamin l⁻¹ (Gln, Gibco, USA) untuk kultur embrio *in vitro*.

Panen dan kultur embrio

Panen dan kultur embrio dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut: (1) Superovulasi dilakukan dengan menggunakan hormon pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) dan human chorionic gonadotropin (hCG), yaitu disuntik melalui

intra peritoneal dengan 5 IU PMSG, dua hari kemudian disuntik melalui intra peritoneal dengan 5 IU hCG dan mencit segera dikawinkan. Keesokan harinya dilakukan pemeriksaan sumbat vagina (h1), yang menandakan mencit telah kawin; (2) Mencit betina yang positif kawin dipanen dengan beberapa cara: (i) sigot (h1) dipanen dengan penorehan pada bagian tuba; (ii) 8-sel (h3) dilakukan pembilasan tuba; dan (iii) morula kompak (h4) dilakukan pembilasan pada ovidak (cara i, ii dan iii dilakukan di bawah mikroskop); (3) Pencucian dilakukan berturut-turut di dalam medium PBS dan medium kultur masing-masing sebanyak tiga kali; (4) Embrio diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% modifikasi pada suhu 37°C.

Pengamatan embrio

Pengamatan perkembangan embrio untuk setiap tahap embrio yang dipanen (h1, h3 dan h4) dilakukan tiap 24 jam inkubasi. Parameter yang diamati adalah jumlah embrio yang berkembang menjadi 2-, 4-, 8-sel, morula dan blastosis selama 96 jam masa inkubasi (4 hari) untuk tahap sigot (h1), sedangkan untuk tahap 8-sel (h3) dan morula kompak (h4) diamati selama 48 jam inkubasi. Evaluasi dilakukan berdasarkan persentasi embrio yang berkembang per jumlah embrio yang dikultur.

HASIL

Pengaruh penambahan asam amino terhadap perkembangan sigot

Penambahan asam amino ke medium kultur M16 terhadap perkembangan sigot mencit dibandingkan dengan kontrol tidak menunjukkan perbedaan nyata ($P > 0,05$) masing-masing untuk penambahan BSA, MEM, dan MEM+Gln, yaitu 65, 63, dan 71% untuk mencapai tahap 2-sel; 24, 24 dan 25% untuk mencapai tahap 4-sel; serta 10, 11 dan 6% untuk mencapai tahap 8-sel (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa asam amino dapat dipakai sebagai pengganti BSA dalam rangka membuat medium yang komposisi kimia diketahui dengan tepat (*chemically defined medium*).

Tabel 1. Pengaruh penambahan asam amino ke dalam medium kultur M16 terhadap perkembangan sigot selama 96 jam masa inkubasi

Medium kultur	Σ embrio yang Dikultur	Σ embrio yang dikultur (%)				
		2-sel	4-sel	8-sel	Morula	Blastosis
M16+BSA	88	57 (65) ^a	21 (24) ^a	9 (10) ^a	0 (0)	0 (0)
M16+MEM	54	34 (63) ^a	13 (24) ^a	6 (11) ^a	0 (0)	0 (0)
M16+MEM+Gln	49	35 (71) ^a	12 (25) ^a	3 (6) ^a	0 (0)	0 (0)
M16+BSA+EDTA	34	25 (74) ^a	14 (41) ^a	9 (26) ^a	3 (9)	2 (6)

Keterangan: Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5%

Pengaruh penambahan asam amino terhadap proses pembentukan blastosis

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan asam amino, yaitu MEM dan MEM Glutamin + Gln ke dalam medium kultur M16, mampu mendukung perkembangan embrio tahap 8-sel masing-masing 75 dan 78% untuk mencapai tahap

morula kompak, 23 dan 37% untuk mencapai tahap blastosis serta 23 dan 37% untuk mencapai tahap blastosis ekspans. Hasil ini tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dibandingkan dengan penambahan BSA, yaitu 76% (morula kompak) dan 28% (blastosis) serta 11% (blastosis ekspans) seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh penambahan asam amino ke dalam medium kultur M16 terhadap perkembangan embrio tahap 8-sel selama 48 jam masa inkubasi

Medium kultur	Jumlah morula Yang di kultur	Jumlah embrio yang berkembang (%)			
		MK	Blastosis	BE	Hatching
M16+BSA	78	59 (76) ^a	22 (28) ^a	9 (11) ^a	0 (0)
M16+MEM	63	47 (75) ^a	11 (23) ^a	2 (4.2) ^a	0 (0)
M16+MEM+Gln	79	62 (78) ^a	29 (37) ^a	12 (15) ^a	5 (6)

Keterangan: Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5%
 MK = morula kompak, BE = blastosis ekspans

Pengaruh penambahan asam amino terhadap proses hatching

Hasil uji lanjut menunjukkan penambahan asam amino ke dalam medium kultur M16 terhadap perkembangan morula kompak ke tahap perkembangan selanjutnya tidak berbeda nyata ($P>0.05$) dengan medium kontrol (+BSA), yaitu 73% (MEM), 84% (MEM + Gln), dan 80% (BSA) (Tabel 3). Ini

menunjukkan bahwa asam amino dapat menggantikan BSA untuk mendukung perkembangan embrio tahap morula kompak ke tahap blastosis. Demikian juga untuk mencapai tahap blastosis ekspans, yaitu 13, 19 dan 10% untuk masing-masing penambahan MEM, MEM + Gln dan BSA.

Tabel 3. Pengaruh penambahan asam amino ke dalam medium kultur M16 terhadap perkembangan embrio tahap morula kompak selama 48 jam masa inkubasi

Medium Kultur	Jumlah morula Kompak yang dikultur	Jumlah embrio yang berkembang (%)		
		Blastosis	BE	Hatching
M16+BSA	30	24 (80) ^a	2 (10) ^a	1 (5) ^a
M16+MEM	30	22 (73) ^a	4 (13) ^a	1 (3) ^a
M16+MEM+Gln	31	26 (84) ^a	6 (19) ^a	4 (13) ^a

Keterangan: Angka-angka dalam satu lajur yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda pada taraf nyata 5%
 MK = morula kompak, BE = blastosis ekspans

PEMBAHASAN

Pengaruh penambahan asam amino terhadap perkembangan sigot

Walaupun hasil uji lanjut tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$) namun berdasarkan nilai persentasi terlihat pada medium M16 + MEM + Gln lebih tinggi persentasinya untuk mencapai tahap 2-sel (71%). Tingginya persentasi perkembangan pada media yang ditambahkan glutamin mungkin disebabkan pada tahap awal pembelahan (sigot) dibutuhkan energi yang tinggi yang dapat diperoleh dengan penambahan glutamin. Karena glutamin

dapat langsung dimanfaatkan melalui metabolisme mitokondria (melalui siklus Krebs). Hal ini sesuai dengan Eagle (1995) yang menyatakan pada beberapa sel, perubahan glutamin ke-2 ketoglutarat dapat meningkatkan pemecahan gugus karbon sebagai penghasil energi untuk pemecahan asam amino yang lain. Adapun energi yang diperoleh dari glukosa tidak dapat dimanfaatkan secara maksimal karena pada awal pembelahan glukosa tidak dapat ditranspor ke mitokondria akibat menurunnya laju glikolisis karena adanya peristiwa negative feedback yang dapat menghambat enzim fosfofruktokinase (Gardner dan Leese, 1990).

Memasuki tahap 8-sel, penambahan MEM + Gln menunjukkan persentasi perkembangan embrio yang menurun (6%) dibandingkan dengan MEM (11%). Hal ini disebabkan metabolisme glutamin pada proses pembelahan embrio tahap 4-sel ke 8-sel menurun. Hal ini sejalan dengan penelitian Chatot *et al.* (1990) yang melakukan pengukuran metabolisme glutamin secara *in vitro* menunjukkan bahwa metabolisme meningkat dari tahap pembelahan sigot (1-sel) ke tahap 2-sel, menurun pada tahap 8-sel, namun kemudian meningkat lagi dan mencapai maksimum pada tahap blastosis. Reiger *et al.* (1992) menyatakan bahwa enzim yang berperan dalam metabolisme glutamin pada tahap perkembangan 2-sel dan 4-sel berasal dari maternal, namun enzim ataupun mRNA yang berasal dari maternal mulai menurun secara signifikan pada tahap 8-sel karena degradasi.

Setelah 48 jam masa inkubasi, embrio yang mencapai tahap 8-sel umumnya mengalami degenerasi. Jika dibandingkan dengan penambahan BSA + EDTA, tampak bahwa sigot mampu melewati tahap 8-sel dan mencapai tahap blastosis di dalam medium kultur dan ini sejalan dengan hasil penelitian Nasr-Esfahani *et al.* (1992). Penambahan EDTA ke dalam medium kultur dapat melindungi embrio secara eksternal (*chelating agent*) terhadap pengaruh logam, hydrogen peroksida dan radikal bebas yang konsentrasi bahan-bahan ini diketahui tinggi di dalam medium kultur Nasr-Esfahani *et al.* (1992).

Pengaruh penambahan asam amino terhadap proses pembentukan blastosis

Pengambilan asam amino untuk pembentukan blastosis pada mencit, mungkin bukan untuk sintesis protein saja, tetapi juga untuk melaksanakan keperluan metabolisme lain atau sebagai substrat untuk menghasilkan energi. Energi dibutuhkan lebih banyak pada kompaksi, karena pada saat ini sel-sel mulai berintegrasi (blastomer luar menjadi kutub polar, sedangkan blastomer dalam menjadi apolar) untuk membentuk rongga blastosul. Proses di atas membutuhkan sumber energi yang tinggi seperti dihasilkan oleh glutamin.

Devreker *et al.* (2001) menggunakan media Earle's + glutamin, Earle's + asam amino dan K-SCIM persentasi perkembangan embrio manusia yang berkembang mencapai blastosis berturut-turut adalah 40.5%, 58% dan 59%. Persentasi perkembangan blastosis lebih tinggi dibandingkan menggunakan media M16 pada penelitian ini karena media Earle's dan K-SCIM lebih kompleks nutrisi untuk mendukung perkembangan embrio manusia secara *in vitro*. Media tersebut diberi tambahan taurin dan 20

asam amino yang sesuai dengan konsidi alamiah pada saluran reproduksi wanita. Sementara media M16 pada penelitian ini menghindari penambahan *unknown factor* agar mengetahui penghambatan perkembangan embrio.

Biggers *et al.* (2005) mengatakan penambahan asam amino dalam medium KSOM tanpa pergantian media, dapat menyebabkan sigot berkembang secara efektif mencapai tahap blastosis pada hari ke-5. Hal ini menunjukkan penambahan asam amino tidak bersifat toksik dalam mempengaruhi perkembangan sigot mencit. Lebih lanjut Macklon *et al.* (2002) melakukan kultur sigot manusia dengan menggunakan media yang disebut Rotterdam yang disuplementasi dengan asam amino telah berhasil melahirkan bayi normal. Hal ini menunjukkan penambahan asam amino sangat mendukung perkembangan embrio kultur pada tahap preimplantasi.

Pengaruh penambahan asam amino terhadap proses *hatching*

Berdasarkan persentasi *hatching*, terlihat medium yang ditambahkan MEM + Gln lebih tinggi dibandingkan medium yang hanya ditambahkan MEM saja, yaitu 13% dan 3%. Ada indikasi bahwa untuk mencapai *hatching* dibutuhkan sumber energi yang tinggi, sehingga bila medium hanya ditambahkan MEM saja, energi yang dibutuhkan untuk proses *hatching* tidak tercukupi. Ini sesuai dengan penelitian Reiger dan Guay (1998) dalam Jamsidi dan Kaye (1995) yang menyatakan glutamin dapat dimetabolisme oleh blastosis sapi. Glutamin merupakan prekursor untuk sintesis protein dan biosintesis pirimidin.

Tingginya persentasi *hatching* pada medium yang ditambahkan asam amino, dimungkinkan karena menurut Lamb dan Leese (1994) perubahan sistim transport asam amino banyak terjadi pada tahap blastosis, sehubungan dengan meningkatnya kompetisi *uptake* asam amino. Untuk perkembangan dari tahap blastosis ke *hatching* dibutuhkan sumber energi dalam jumlah yang banyak. Asam amino dapat dimanfaatkan sebagai salah satu sumber energi yang dapat digunakan untuk perkembangan embrio.

Keberadaan asam amino non esensial dan atau asam amino esensial dapat bertindak sebagai prekursor dalam medium kultur yang secara langsung dapat mempengaruhi proses blastosis ke *hatching*. Namun demikian asam amino esensial yang terdapat dalam MEM tidak dapat meningkatkan persentasi proses *hatching* lebih baik dari medium yang ditambahkan BSA. Ini menunjukkan bahwa

asam amino esensial yang ada dalam MEM kurang lengkap untuk dapat meningkatkan proses *hatching*. Menurut Spindle dan Pederson (1973) dalam Schiewe *et al.* (1995) bukti secara *in vitro* mendukung konsep bahwa proses *hatching* dan implantasi merupakan peristiwa eksklusif yang dipengaruhi oleh perbedaan pengambilan asam amino dan protein.

Pada peristiwa *hatching* terjadi perubahan bentuk pada zona pelusida bagian polar tropotokoderm, yang menunjukkan bahwa informasi seperti perubahan, merupakan hal penting pada blastosis untuk proses *hatching*. Niimura dan Fujii (1997) telah membuktikan ada dua pola perubahan bentuk dalam proses *hatching*, perubahan besar pada blastosis ekspans dan perubahan kecil berupa penonjolan pada bagian tropoblastin, proliferasi dan implantasi. Semua peristiwa di atas dikontrol oleh ICM (*inner cell mass*).

Biggers *et al.* (2005) dengan melakukan transfer blastosis yang dikultur dalam media KSOMg + asam amino dan media G1.2 menunjukkan persentase fetus yang lahir masing-masing yaitu 67.6% dan 46.6%. Ini menunjukkan penambahan asam amino yang lebih kompleks dapat meningkatkan proses *hatching* dan selanjutnya melakukan implantasi pada uterus induk.

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perubahan asam amino esensial minimum (MEM) dengan asam amino nonesensial glutamin dapat digunakan sebagai pengganti serum (BSA) untuk perkembangan embrio mencit *in vitro*.

Berdasarkan hasil penelitian ini, maka disarankan agar dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap medium kultur M16 yang ditambahkan asam amino esensial minimum dengan dan tanpa asam nonesensial glutamin yang diikuti dengan senyawa yang dapat bertindak sebagai *chelating agent* seperti EDTA.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dr. Arief Boediono, Dr. Hasim, DEA dan Prof. Dr. drh. Yuhara Sukra yang banyak memberikan pengarahan dan masukan yang berharga untuk menyelesaikan penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

Aurich C and Han J 1994. *In vitro* maturation, fertilization, and culture of bovine oocytes in a modified menezzo B2 medium. *Anim. Reprod. Sci.* 35: 153-163.

- Biggers JD, McGinnis LK and Lawitts JA 2005. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Hum Reprod.* 20 (12) : 3376-3384.
- Brinster RL 1973. Nutrition and metabolism of the ovum, zygote and blastocyst. In Geiger SR. (Ed). *Endocrinology*. American Physiological Society, Washington. 165-185
- Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL and Torres I 1989. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Reprod. Fertil.* 86: 679-688.
- Chatot CL, Lewis JL, Torres I and Ziomek CA 1990. Development of 1-cell mouse embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.* 42: 432-440.
- Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani, Englert Y 2001. Amino acids promote human blastocyst development *in vitro*. *Human Reprod.* 16 (4) : 749-759.
- Eagle H 1995. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Nature.* 122: 501-509.
- Gardner DK and Leese HJ 1990. Concentration of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryos development and metabolism *in vitro*. *Reprod. Fertil.* 88: 361-368.
- Jamshidi MB and Kaye PI 1995. Glutamine transport by mouse inner cell masses. *Reprod. Fertil.* 104: 91-97.
- Lamb VK and Leese HJ 1994. Uptake of a mixture of amino acids by mouse blastocysts. *Reprod. Fertil.* 102: 169-179.
- Macklon NS, Plieters MHEC, Hassan MA, Jeuchen PHM, Eijkemans MJC and Fauser BCJM 2002. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in-vitro* human blastocyst development. *Hum Reprod.* 17: 2700-2705.
- Miyoshi K, Punahshi H, Okuda K and Niwa K 1994. Development of rat one-cell embryo in a chemically defined medium: Effects of glucose, phosphate and osmolarity. *Reprod. Fertil.* 100: 21-26.
- Nasr-Esfahani MH and Johnson MH 1991. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured *in vitro*. *Dev.* 113(2): 551-600.
- Nasr-Esfahani MH, Winston NJ and Johnson MH 1992. Effects of glucose, glutamine, ethylenediaminetetraacetic acid and oxygen tension on the concentration of reactive oxygen species and on development of the mouse preimplantation embryo *in vitro*. *Reprod. Fertil.* 92: 219-231.
- Niimura S and Fujii 1997. A morphological study of blastocyst hatching in the mouse and rat. *Reprod. Dev.* 43(4): 295-302.
- Reiger D, Loskutoff NM and Betteridge KJ 1992. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryo produced and co cultured *in vitro*. *Reprod. Fertil.* 100: 257-262.
- Schiewe MC, Hazeleger NL, Sclimenti C and Balmaceda JP 1995. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil. Steril.* 63(2): 288-294.
- Seshagiri PB and Bavister BD 1991. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the crabtree effect. *Mol. Reprod. Dev.* 30: 105-111.
- Steel RGD and Torrie JH 1989. *Prinsip dan Dasar Statistik*. Edisi 2. PT Gramedia, Jakarta.