

KOLEKSI SEL TELUR DENGAN TEKNIK LAPAROSKOPI UNTUK PRODUKSI EMBRIO DAN TRANSFER EMBRIO PADA DOMBA

Mohamad Agus Setiadi¹⁾, Iman Supriatna¹⁾ dan Arief Boediono²⁾

ABSTRACT

LAPAROSCOPIC OVUM PICK UP FOR IN VITRO EMBRYO PRODUCTION AND EMBRYO TRANSFER IN SHEEP

An experiment was carried out to analyze the application of laparoscopic technique for oocyte collection, *in vitro* embryo production and embryo transfer in sheep. The First experiment was conducted to observe effect of gonadotropin stimulation on follicle development and laparoscopic technique for oocytes aspiration. In the second experiment, effect of culture system on the embryo development *in vitro* was assessed and in the third experiment, the application of laparoscopic for embryo transfer has been conducted. The Result showed that single dose of gonadotrophin was sufficient to support follicle development significantly and it could help follicle visualization. It also showed that laparoscopic ovum-pick up could be conducted weekly without any restriction. The second series experiment showed CR1aa culture system was better than TCM 199 (29.90% vs 8.00%) and the changing of media was required to ensure better metabolism process for embryos. The third experiment revealed that embryo transfer could be conducted with an aid from laparoscope. In conclusion, single dose PMSG stimulation is sufficient to support follicle development for *laparoscopic ovum-pick up*, the culture media changing affects the successful rate of *in vitro* embryo production (8% vs 25.66%) and the laparoscopy technique can be used safely for embryo transfer on sheep.

Keyword. Laparoscopic, oocyte, embryo transfer, sheep

ABSTRAK

Penelitian telah dilakukan untuk mengamati aplikasi teknik laparoskopi untuk koleksi sel telur, produksi embrio *in vitro* serta aplikasi transfer embrio pada domba. Penelitian pertama dilakukan untuk melihat pengaruh stimulasi gonadotropin pada perkembangan folikel dan teknik pengambilan dengan laparoskopi. Penelitian kedua mengamati pengaruh sistem kultur terhadap perkembangan embrio *in vitro*, sementara penelitian ketiga melihat aplikasi transfer embrio dengan teknik laparoskopi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dosis tunggal PMSG mampu membantu menstimulasi perkembangan folikel secara nyata, membantu visualisasi serta dapat dilakukan pengambilan oosit setiap minggu tanpa hambatan. Penelitian tahap kedua menunjukkan bahwa sistem kultur yang diterapkan

akan dapat meningkatkan perolehan embrio pada produksi embrio *in vitro* (8.00%-29.90%). Media CR1aa lebih cocok untuk perkembangan embrio domba *in vitro* dibandingkan dengan TCM 199 (29.90% Vs 8.00%). Pergantian media dari TCM 199 ke CR1aa dapat memperbaiki perolehan embrio (8.00% vs 25.66%). Sementara itu teknik laparoskopi dapat diaplikasikan untuk pelaksanaan transfer embrio pada ternak domba.

Kata Kunci: Laparoskopi, Oosit, transfer embrio, domba

PENDAHULUAN

Transfer embrio telah diakui dapat meningkatkan kualitas dan kuantitas ternak secara cepat. Namun perkembangan bioteknologi reproduksi ini pada ternak domba tidak sepesat perkembangan pada ternak besar seperti sapi (Cognie 1999), sehingga perbaikan kualitas genetik pada kelompok ruminansia kecil ini masih tertinggal. Oleh karena itu diperlukan terobosan tentang aplikasi metode terbaru dari bioteknologi

Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Telp./Fak. : 0251-623940. E-mail: [masetiad\(5\)indo.net.id](mailto:masetiad(5)indo.net.id)

²⁾ Bagian Embriologi, Departemen Anatomi Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

reproduksi untuk mendukung penerapan lebih luas dalam rangka peningkatan mutu genetik ternak.

Produksi embrio *in vitro* merupakan salah satu alternatif untuk meningkatkan mutu genetik ternak apabila metode konvensional biasa tidak mungkin dilakukan. Namun, diperlukan ketersediaan sumber sel telur dan sperma dalam jumlah yang cukup. Sumber sel telur dari donor hidup dipercaya mempunyai potensi dan viabilitas yang lebih baik dalam memproduksi embrio *in vitro* apalagi yang berasal dari donor yang mempunyai mutu bagus (Baldassere *et al.* 2002). Pengambilan oosit dari donor hidup secara berulang diikuti dengan produksi embrio *in vitro* mempunyai potensi untuk menghasilkan keturunan dari donor yang secara genetik unggul daripada superovulasi yang konvensional dan transfer embrio biasa (Baldassare *et al.* 1996). Pada ternak sapi, teknik pengambilan oosit tidak mendapat penghambatan yang berarti karena bentuk organ reproduksi yang mudah dijangkau oleh tangan melalui palpasi per rektal. Sementara itu pada ternak ruminansia kecil tidak sesederhana pada hewan besar. Di samping itu hambatan paling besar aplikasi pengambilan oosit dari donor hidup dan aplikasi bioteknologi lainnya pada ruminansia kecil yaitu struktur serviks yang rigid, meskipun Flohr *et al.* (1999) telah berhasil melakukan pengambilan melalui serviks dengan terlebih dahulu dirangsang dengan pemberian estrogen dan atau oksitosin untuk merangsang terjadinya relaksasi serviks.

Teknik laparoskopi merupakan metode yang dapat dilakukan untuk menjamin ketersediaan oosit dari donor hidup dan alat bantu dalam rangka penerapan bioteknologi reproduksi lainnya. Melalui teknik laparoskopi dapat diperoleh sejumlah oosit dari donor yang tetap dibiarkan hidup karena teknik ini hanya menimbulkan sedikit perlukaan dan proses persembuhan luka yang lebih cepat. Disamping itu, pendekatan gelombang folikel dan stimulasi hormonal juga dilakukan untuk memperoleh perkembangan folikel yang optimum sehingga akan didapatkan sejumlah oosit yang diperlukan.

Penelitian ini diharapkan mampu menerapkan metode terbaik untuk stimulasi ovarium dalam mendukung perkembangan folikel dan mencari solusi untuk memperoleh sejumlah oosit dan peman-

faatannya untuk produksi embrio *in vitro*. Penelitian diarahkan untuk (1) teknik stimulasi hormonal mengacu pada dinamika gelombang perekrutan folikel, (2) penerapan teknik laparoskopi untuk untuk koleksi oosit dan analisis perolehan oosit serta mutu oosit, (3) pemanfaatannya oosit untuk produksi embrio *in vitro*, serta (4) aplikasi transfer embrio hasil produksi embrio *in vitro* dengan bantuan laparoskopi.

METODE

Bahan

Hormon untuk penyerentakan berahi dan superovulasi: Prostaglandin F_{2a} (Prosolvin®) dan *Pregnant Mare Serum Gonadotrophs* (PMSG) (Intervet-Holland), Choullon® (Intervet-Holland), Progesterone-CIDR® (Pharmacia and Upjohn, New Zealand), Bahan untuk laparoskopi: Xylazin (Xylazil®, Troy Laboratory), Ketamin (Ketavet®-Delvet PTY), disinfektan dan antibiotik (Penstrep®), benang jahit *catgut*, medium aspirasi dan koleksi oosit: *phosphate buffer saline* (PBS, Sigma), *fetal bovine serum*, heparin (Sigma), antibiotik (Sigma) serta bahan kimia lainnya seperti disebutkan dalam metoda penelitian.

Hewan yang digunakan pada penelitian ini terutama sebagai donor sel telur pada teknik laparoskopi dan resipien pada transfer embrio adalah ternak domba Garut yang telah minimal satu kali beranak dan telah diadaptasikan beberapa bulan pada lingkungan tempat penelitian serta mempunyai siklus reproduksi yang normal.

Penelitian I: Pengaruh Stimulasi Hormonal terhadap terhadap perkembangan folikel untuk laparoskopi

Seleksi dan Penyiapan Hewan Donor

Hewan donor dibagi dalam tiga kelompok perlakuan berdasarkan waktu pengambilan oosit dengan laparoskopi. Pada **kelompok A** pengamatan estrus dan pengambilan oosit dilakukan tiap minggu dengan terlebih dahulu diberi suntikan hormonal untuk superovulasi (1500 IU PMSG); pada **kelompok B** pengamatan estrus dan pengambilan oosit dilakukan setiap 2 minggu (± 1 siklus) dengan terlebih dahulu dilakukan penyuntikan hormonal untuk superovulasi (1500 IU PMSG), sedangkan **kelompok C** sebagai kontrol pengamatan dan pengambilan oosit

dilakukan setiap 2 minggu (\pm 1 siklus) tanpa perlakuan hormonal (Tabel 1).

Tabel 1 Bagan rancangan percobaan penelitian

Kelompok Percobaan	Waktu Laparoscopi	Perlakuan Hormonal (Superovulasi)
A	Tiap Minggu	Ya
B	Tiap 2 Minggu	Ya
C (Kontrol)	Tiap 2 Minggu	Tidak

Penyeragaman Siklus Estrus dan Stimulasi Pertumbuhan Folikel

Untuk menyeragamkan status estrus hewan dilakukan penyuntikan 7,2 mg Prosolvin® IM. Berahi diamati setiap hari setelah penyuntikan baik dengan detektor estrus maupun dengan memasukkan pejantan yang dipasang apron. Hewan yang menunjukkan tanda-tanda estrus dan adanya reaksi diam dinaiki dianggap sebagai hari estrus (hari ke-0). Interval waktu pengambilan oosit dilakukan berdasarkan tanda-tanda ini.

Untuk meningkatkan jumlah folikel yang terbentuk dan memudahkan visualisasi folikel, superovulasi dilakukan dengan pemberian dosis tunggal PMSG 1500 IU dua hari sebelum LOPU dilakukan menurut metode Stang *eta/*. (1999).

Teknik Laparoscopi untuk Panen dan Koleksi Oosit

Perangkat Laparoscopi terdiri dari *te/eskop* 7 mm, kabel cahaya, sumber cahaya, trocard berukuran 5-7 mm dan tang penjepit yang bersifat atraumatik. Hewan donor terlebih dahulu dipuasakan 18-24 jam sebelum pelaksanaan laparoscopi. Sebelum laparoscopi dilakukan, hewan dianastesi terlebih dahulu dengan memberikan kombinasi antara 0.01-0.22 ml/20 kg bobot badan ilium xylazil dikombinasi dengan penyuntikan ketamin 11-22 mg/kg bobot badan secara *intra muscular (IM)*.

Hewan yang sudah teranastesi dicukur pada daerah yang akan dilaparoscopi dan diberi disinfektan. Kemudian hewan yang sudah teranastesi ditempatkan pada *craddle* dengan posisi membentuk 30° dan diikat pada tiap bagian ujung-ujung (ektremitas).

Pada posisi demikian, kemudian trokard dimasukkan dengan terlebih dahulu membuat lubang kecil dengan *verres needle* untuk orientasi lokasi. Selongsong trokard kemudian diganti, diisi dengan teleskop dan disambungkan dengan sumber gas CO₂ untuk melonggarkan ruang abdomen sehingga memudahkan visualisasi organ reproduksi. Untuk memudahkan memfiksasi bagian organ yang diperlukan, maka dibuat lagi dua lubang kecil di bagian kiri dan kanan daerah abdomen.

Untuk orientasi letak ovarium dilakukan penyisiran organ reproduksi dengan menggunakan tang penjepit yang bersifat atraumatik. Ovarium yang terlihat, difiksasi dan jumlah folikel yang terlihat dihitung.

Aspirasi folikel dilakukan dengan menyedot cairan (punksi) dengan jarum ukuran 18G yang dihubungkan dengan spoit yang berisi cairan melalui selang. Penusukan dilakukan berulang-ulang untuk mendapatkan sejumlah cairan dan oosit. Untuk mengurangi akibat negatif setelah penusukan seperti adanya kemungkinan perlekatan, permukaan ovarium dicuci dengan menyemprotkan larutan fisiologis. Lubang yang terbentuk akibat pemasangan trokard dijahit seperlunya. Prosedur laparoscopi dilakukan secara berulang 3 kali pada setiap hewan.

Penelitian II: Pengaruh Kultur Media pada Perkembangan Embrio Domba *in Vitro*

Koleksi dan seleksi sel telur

Ovarium diambil dari rumah potong hewan dan dibawa ke Laboratorium menggunakan media transportasi NaCl fisiologis (0.9 w/v) pada suhu 30°C dalam waktu kurang dari 3 jam. Sel telur dikoleksi dengan cara mencacah ovarium dengan menggunakan pisau bedah (skalpel) steril. Bekas bagian yang tercacah disemprot dengan larutan NaCl fisiologis yang ditampung pada cawan petri berdiameter 56 pm. Cairan yang terkumpul diamati di bawah mikroskop menggunakan perbesaran tertentu untuk melihat sel telur yang terkumpul. Sel telur yang terlihat diambil menggunakan pipet pasteur yang telah dimodifikasi dengan diameter sama dengan diameter oosit dan dikumpulkan pada media PBS yang disuplementasi dengan 10% FBS dan antibiotik penisilin dan streptomisin. Penentuan mutu oosit

mengacu pada pengamatan morfologis berdasarkan jumlah kumulus sel yang mengelilingi dan mutu sitoplasma yang homogen. Oosit yang memenuhi kriteria dicuci sebanyak 3 kali pada larutan PBS yang disuplementasi serum dan satu kali pada media pematangan yang akan digunakan.

Pematangan oosit *in vitro*

Proses pematangan adalah upaya mengkultur oosit untuk mencapai tahap metaphase II supaya oosit tersebut siap dibuahi. Pematangan dilakukan pada media yang terdiri atas TCM 199 yang disuplementasi dengan 10% FBS, 10 IU/ml Folligon®, 10 IU/ml Chorullon® dan 1 µg/ml estradiol benzoate®. Pematangan dilakukan pada cawan petri yang mengandung 2 ml media pematangan dan diinkubasi pada inkubator 5% CO₂, 39°C dengan kelembapan maksimum selama 24 jam.

Fertilisasi oosit *in vitro*

Straw semen beku dicairkan (*thawing*) pada suhu 37°C selama 30 detik. Semen yang sudah cair ditempatkan pada media *swim up* pada suhu inkubator CO₂ (39°C) untuk memilih sperma yang motil dan agar spermatozoa mengalami proses *kapasitasi*. Bagian atas cairan tabung dipindahkan pada tabung lain untuk kemudian disentrifus pada laju 500G selama 8 menit. Pelet yang terbentuk diencerkan lagi dengan *swim up* media dan disentrifus lagi dengan laju dan waktu yang sama dengan prosedur sebelumnya. Pelet yang terbentuk pada sentrifus kedua dihitung konsentrasinya dengan kamar hitung Neubauer untuk kemudian diencerkan dengan media fertilisasi. Oosit yang akan difertilisasi dipindahkan dari media pematangan ke media fertilisasi kemudian digabungkan dengan sperma yang telah dihitung konsentrasinya. Proses fertilisasi dilakukan pada media drops dan spermatozoa dengan oosit dibiarkan berinteraksi selama lebih kurang 24 jam pada inkubator 5% CO₂ pada suhu 39°C.

Kultur embrio *in vitro*

Supaya oosit yang terfertilisasi (zigot) mengalami perkembangan yang sempurna sampai terbentuk embrio, zigot tersebut ditempatkan pada media kultur yang cocok untuk perkembangannya. Oleh karena media ini merupakan media terlama yang

dipakai untuk perkembangan embrio, media ini mengandung banyak komponen yang mendukung metabolisme embrio. Pada penelitian ini digunakan media yang berbeda, yaitu TCM 199 dan media Charles Rosenkrans laa (CR1aa) serta kombinasi pergantian media TCM 199 ke CR1aa. Embrio dikultur selama 7 hari pada inkubator 5% CO₂ 39°C dengan kelembapan maksimum. Parameter yang diamati meliputi tingkat pembelahan embrio, jumlah embrio yang terbentuk sampai tahap morulla sebagai indikator kemampuan media untuk mendukung perkembangan embrio *in vitro*.

Penelitian III: Implementasi Transfer Embrio pada Domba Menggunakan Laparoskop

Sinkronisasi resipien

Sinkronisasi estrus resipien dilakukan dengan memasang implant-progesteron-CIDR secara intravaginal selama 12 hari. Setelah implan dicabut, rata-rata 2 hari kemudian hewan menunjukkan gejala estrus (hari ke-0). Tujuh hari setelah gejala estrus terlihat dilakukan transfer embrio dengan embrio beku maupun embrio segar.

Pencairan embrio beku dan transfer embrio

Embrio beku maupun embrio segar ditransfer pada resipien yang sudah disinkronisasi siklus estrusnya. Untuk embrio beku, embrio terlebih dahulu dilakukan pencairan sebagai berikut: Straw embrio beku dikeluarkan dari kontainer N₂ cair dan dilakukan proses pencairan kembali (*warming*) dengan mengangin-udarkan selama 10 detik. Selanjutnya proses rehidrasi dilakukan berturut-turut dengan membilas embrio pada medium sebagai berikut:

1. mPBS + 20% serum + 0.5M Sukrosa
2. mPBS + 20% serum + 0.25M Sukrosa
3. mPBS + 20% serum + 0.1M Sukrosa
4. mPBS
5. Medium kultur

Pembilasan dilakukan selama 1-2 menit dalam setiap media tersebut. Embrio yang telah mengalami rehidrasi selanjutnya dikultur kembali dalam inkubator 5%CO₂, 39°C. Transfer embrio dilakukan pada hewan resipien dalam keadaan teranastesi seperti prosedur teknik laparoskop untuk panen dan koleksi oosit.

Evaluasi keberhasilan transfer embrio

Keberhasilan embrio yang ditransfer dilihat dari jumlah resipien yang berhasil menjadi bunting. Teknik pemeriksaan kebuntingan dilakukan dengan menggunakan ultrasonografi. Di samping itu beberapa hari sebelum diperiksa dengan USG, dilakukan analisis konsentrasi estriol dalam urin sebagai bahan perbandingan deteksi kebuntingan.

HASH DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 2 terlihat bahwa pembentukan folikel terlihat lebih banyak dan berbeda nyata pada kelompok donor yang dilakukan superovulasi (Kelompok A dan B) dibandingkan dengan kelompok donor kontrol yang tidak distimulasi dengan hormon. Hasil ini sejalan dengan hasil yang diperoleh Stang *et al.* (1999) yang memperoleh rata-rata 12.2 dan 14.9 folikel masing-masing untuk perlakuan seperti kelompok A dan B.

Tabel 2 Jumlah perkembangan folikel setelah stimulasi Gonadotrophin

Kelompok	Total Folikel terlihat Waktu pengambilan			Total Folikel	Rataan Folikel per pengambilan
	I	II	III		
	A (Tiap minggu +PMSG)	23	16		
B (Tiap 2 minggu + PMSG)	21	23	24	68	11.30 ^b
C (Tiap 2 minggu tanpa PMSG)	7	6	8	21	3.50 ^c

^{ab} Superscript yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang nyata

Sementara itu hasil perolehan oosit dengan teknik laparoscopi masih rendah (Tabel 3) jika dibandingkan dengan hasil yang diperoleh Baldassere *et al.* (2002) dan Stang *et al.* (1999), yang mampu mengkoliksi oosit lebih dari 80% dari total folikel yang terlihat. Kendala rendahnya perolehan oosit di antaranya karena teknik aspirasi yang bersifat manual yaitu folikel disedot dengan jarum yang dihubungkan dengan selang dan spoit sehingga daya hisap tidak terlalu kuat dan kemungknan oosit hilang di tengah perjalanan seperti yang ditunjukkan oleh Rodriguez *et al.* (2006).

Tabel 3 Total perolehan oosit pada teknik laparoscopi

Kelompok Perlakuan	Total Folikel Terlihat			Total Folikel teraspirasi			Folikel Teraspirasi (%)
	I	II	III	I	II	III	
A (Tiap minggu + PMSG)	23	16	21	4	2	2	13.33
B (Tiap 2 mnggu + PMSG)	21	23	24	2	1	4	10.29
C (Tiap 2 minggu tanpa PMSG)	7	6	8	0	0	3	14.29

Alasan lain rendahnya perolehan oosit juga dilaporkan oleh Baldassarre *et al.* (2002) sebagai akibat penyuntikan gonadotropin 48 jam sebelum aspirasi seperti yang dilakukan dalam penelitian ini karena menghasilkan sejumlah folikel besar yang mempunyai isi yang lebih padat dan sejumlah oosit yang mempunyai kumulus sel yang besar dan lengket sehingga menyulitkan penyedotan. Baldassarre *etal.* (2002) menyarankan pemberian dosis tunggal gonadotropin dilakukan 36 jam sebelum aspirasi dilakukan.

Pada penelitian tahap kedua dilakukan pengamatan kemampuan media kultur untuk mendukung perkembangan embrio *in vitro*. Terlihat masih beragamnya tingkat perolehan morula pada kedua jenis media dan sistem kultur yang dilakukan (Tabel 4).

Tabel 4 Perkembangan embrio pada berbagai medium kultur

Media Kultur	Jumlah Oosit	Ulangan	Tingkat Pembelahan (%)	Morula (%)
TCM 199	125	5	48/125 (38.40)	10/125 (8,00) ^a
TCM 199 - CR1aa	113	5	51/113(45.13)	29/113 (25.66) ^b
CR1aa	97	5	39/97 (40.21)	29/97 (29.90) ^b

^{ab}Superscript yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata

Hasil tersebut menunjukkan bahwa tingkat pembelahan oosit (*cleavage rate*) pada media kultur yang digunakan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini menunjukkan bahwa kultur media yang digunakan dapat mendukung perkembangan awal embrio. Namun, pencapaian oosit berkembang menjadi tahap morula berbeda nyata pada perlakuan sistem kultur. Oosit yang dikultur selama 7 hari pada media TCM 199 menunjukkan angka perkembangan

morula yang lebih rendah (8%) dibandingkan dengan oosit yang dikultur seluruhnya pada media CRIaa (29,90%) maupun oosit yang hanya pada tahap awal saja dikultur pada TCM 199 yang kemudian dipindahkan ke CRIaa (25.66%). Hal ini menunjukkan bahwa pergantian media memperbaiki lingkungan embrio sehingga sisa metabolit yang bersifat toksis dapat dikurangi sejalan dengan penelitian Kajihira *et ai.* (1999) dan Krisher dan Bavister (1999). Dugaan sementara rendahnya perolehan morula pada media TCM 199 adalah karena adanya konsentrasi glukosa yang cukup tinggi pada media tersebut, yang hanya diperlukan pada tahap awal perkembangan seperti yang disarankan Donay (2002) bahwa sedikit glukosa diperlukan embrio sebelum tahap morula atau blastosis. Hal ini juga dibuktikan pada oosit yang dikultur awal pada TCM 199 untuk kemudian dipindahkan ke CRIaa memperlihatkan perkembangan embrio (25.66%) yang lebih baik (Tabel 4).

Meskipun angka pembelahan embrio tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dan sebagai indikasi bahwa embrio mampu berkembang pada tahap awalnya, tampaknya proses perkembangan selanjutnya dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kultur media, juga sering terjadinya gejala hambatan perkembangan embrio yaitu blokade perkembangan embrio, yang pada sapi dan domba sering terhenti pada tahap 8-16 sel (Peters 1992; Bernett dan Bavister 1993).

Pelaksanaan transfer embrio dari hasil produksi embrio *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5 Hasil transfer embrio pada ternak domba

Kode Resipien	Jenis embrio	Diagnosa kebuntingan	
		Pengukuran Estriol	Ultrasonogram
152	Segar	+	
155	Beku		
151	Beku	+	
153	Beku	+	+
154	Segar	+	
157	Beku		

Meskipun tingkat kebuntingan yang diperoleh masih rendah (16.67%), ketidakberhasilan ini bukan semata karena faktor embrio, tetapi banyak faktor

lainnya yang ikut menentukan keberhasilan seperti status reproduksi induk, status embrio serta proses fisiologis individu lainnya. Kekeliruan antara hasil diagnosis dengan pengukuran estriol adalah karena keterlambatan pengukuran estriol sehingga estriol yang terukur dapat juga berasal dari ovarium yang bukan sebagai indikator kebuntingan (Johnson and Everitt 1995). Kegagalan kebuntingan dapat terjadi karena kemampuan yang rendah embrio setelah *vitrifikasi* (Leoni *et ai.* 2001), terjadinya kematian embrio dini serta kemungkinan kondisi hormonal induk. Bahkan dilaporkan kematian embrional dari embrio *in vitro* lebih besar dibandingkan dengan embrio hasil *in vivo* (Martinez *et at.* 2006)

KESIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa stimulasi Gonadotropin 1500 IU dosis tunggal mampu menstimulasi perkembangan folikel yang signifikan untuk koleksi oosit donor dan membantu visualisasi folikel sehingga memudahkan orientasi pengambilan oosit. Waktu pengambilan oosit pada domba dengan teknik laparoskopi dapat dilakukan setiap minggu tanpa adanya hambatan. Perbaikan sistem kultur dapat meningkatkan tingkat perolehan embrio yang layak-transfer. Melalui teknik laparoskopi dapat dilakukan pengambilan sel telur dan aplikasi transfer embrio pada ternak kecil dengan pembedahan yang minimum dan mempunyai tingkat kesembuhan yang cepat.

DAFTAR PUSTAKA

Baldassare, H., Furnus, C.C., de Matos, D.G, Pessi, H. 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis; alternative gonadotrophin treatment for stimulation of oocytes donors. *Theriogenology* 45: 707 - 717

Baldassare, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris,A., Karatzas, C.N. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology* 57(1): 275-84.

Barnett, D.K., Bavister, B.D. 1993. What is relationship between the metabolism of reimplantation embryos and their development competence?. *Moi. Reprod. Dev.* 43: 105-133

- Cognie, Y. 1999. State of the art in sheep - goat embryo transfer. *Theriogenology* 51:105-116
- Donay, I. 2002. Metabolic markers of embryo viability. In assessment of mammalian embryo quality invasive and non invasive techniques. An Van Soom and M. Boerjan (Eds). Kluwer Academic Publishers pp. 57-94
- Flohr, S.F., Wulster-Radcliffe, M.C., Lewis, G.S. 1999. Technical note : Development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. *J. Anim. Sci.* 77:2583-2586
- Johnson, M.H., Everitt, B.J. 1995. Maternal recognition and support of pregnancy. In: Essential Reproduction. 4th Edition. Blackwell Science, USA. Pp. 181-189
- Kajihira, Y., Roses, G., Lago, I., Calvo, J., Fila, D., Crispo, M. 1999. Influence of culture medium on the development of bovine blastocyst. *Theriogenology* 51(1):239
- Krisher, R.L., Bavister, B.D. 1999. Culture medium for bovine oocyte maturation affects resulting blastocyst metabolism. *Theriogenology* 5(1):381
- Leoni, G.L., Bogliolo, P., Pintors, P., Ledda, J., Natana, J. 2001. Sheep embryos derived from FSH/eCG treatment have a lower in vitro viability after vitrification than those derived from FSH treatment. *Reprod. Nutr. Dev.* 41:239-246
- Martinez, A.G., Valcarcel, A., Furnus, C.C., de Matos, D.G., Iorio, G., de las Heras, M.A. 2006. Cryopreservation of in vitro produced ovine embryos. *Small Ruminant Res.* 63:288-296
- Petters, R.M. 1992. Embryo development in vitro to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 28:415-421
- Rodriguez, C., Anel, L., Alvarez, M., Anel, E., Doixo, J.C., Chomoro, C.A., dePaz, P. 2006. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspirator devices for optimal oocyte retrieval. *Reprod. Dom. Anim.* 41:106-113
- Stang, M., Kuhlozer, B., Besenfelder, U., Brem, G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology* 52:709-716