

Injeksi Spermatozoa Domba Hasil Pengeringbekuan ke dalam Sel Telur Menggunakan Teknik *Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)*

(INJECTION OF FREEZE-DRIED RAM SPERMATOZOEA INTO OOCYTES
USING INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION, ICSI)

TAKDIR SAILI¹, MOHAMAD AGUS SETIADI², SRIHADI AGUNGPRIYONO³,
ARIEF BOEDIONO³

¹Jurusan Produksi Ternak, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

² Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

³ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB.

Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Pada penelitian ini dikaji kemampuan spermatozoa domba hasil pengeringbekuan untuk melakukan decondensasi dan membentuk pronukleus setelah diinjeksikan ke dalam oosit dengan menggunakan teknik *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Metode pewarnaan *aceto lacmoid* digunakan untuk mengevaluasi kejadian decondensasi dan pembentukan pronukleus pada oosit setelah ICSI. Hasil penelitian menunjukkan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan dapat melakukan decondensasi (2%) dan mendukung pembentukan 1PN (34%) tetapi belum mampu mendukung pembentukan 2PN setelah diinjeksikan ke dalam oosit. Sedangkan injeksi dengan menggunakan spermatozoa segar mampu mendukung pembentukan 2PN (30%) dan 1PN (40%). Sebagai kesimpulan dapat dikemukakan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan mampu melakukan decondensasi dan mendukung pembentukan 1PN setelah ICSI.

Kata kunci: spermatozoa, pengeringbekuan, sel telur, ICSI, decondensasi, pronukleus

J Vet 2007 8 (1) : 32-39

ABSTRACT

In this experiment, the ability of freeze-dried ram spermatozoa to decondense and to support pronucleus formation after injection into oocyte using ICSI method was evaluated. Aceto lacmoid staining was used to assess decondensation and pronucleus formation following ICSI. Results of these experiments revealed that freeze-dried spermatozoa had the ability to decondense (2%) and to induce 1PN formation (34%) following injection into oocytes but fail to form 2PN. However, 30% of 2PN and 40% oocytes were obtained when oocytes were injected with fresh spermatozoa. In conclusion, freeze-dried ram spermatozoa were able to decondense and to support 1PN formation after ICSI.

Key words: spermatozoa, freeze-dried, oocyte, ICSI, decondensation, pronucleus.

J Vet 2007 8 (1) : 32-39

PENDAHULUAN

Pengeringbekuan merupakan salah satu metode pengawetan spermatozoa melalui proses pembekuan dan penyubliman yang pada akhirnya akan dihasilkan sediaan spermatozoa dalam kemasan kering. Selama masa penyimpanan, kemasan spermatozoa hasil pengeringbekuan dapat ditempatkan dalam lemari es (3-5°C) atau suhu ruang sehingga tidak membutuhkan suplai nitrogen cair yang terus-menerus seperti penyimpanan spermatozoa dalam kemasan beku. Hal ini akan mempermudah pendistribusiannya dari satu tempat ke tempat lain. Namun demikian pemanfaatan spermatozoa hasil pengeringbekuan untuk tujuan fertilisasi sel telur hanya dapat dilakukan melalui teknik *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) karena tidak bersifat motil lagi dan telah mengalami kerusakan struktur membran plasma dan akrosom (Saili *et al.* 2005). ICSI adalah suatu metode fertilisasi mikro menggunakan mikro-manipulator yang terpasang pada mikroskop. Melalui teknik ICSI kita dapat memasukkan secara langsung *spermatozoon* kedalam sitoplasma sel telur sehingga beberapa hambatan dalam fertilisasi normal dapat terabaikan.

Beberapa percobaan fertilisasi melalui teknik ICSI membuktikan bahwa sel telur yang dibuahi oleh spermatozoa hasil pengeringbekuan mampu membentuk pronukleus pada hamster (Hoshi *et al.* 1994) atau berkembang menjadi embrio pada sapi (Keskintepe *et al.* 2001) bahkan dapat berkembang menjadi anak mencit yang normal setelah ditransfer ke resipien (Wakayama dan Yanagimachi 1998). Hal ini dapat terjadi karena integritas DNA spermatozoa diperkirakan masih utuh sehingga mampu mendukung proses fertilisasi dengan baik.

Daya tahan inti spermatozoa terhadap suhu rendah telah dibuktikan dengan lahirnya beberapa anak hasil inseminasi dengan menggunakan spermatozoa beku (Watson 1990). Selain itu, DNA spermatozoa mempunyai pelindung yang dapat mengamankannya dari pengaruh fisik dan kimia. Spermatozoa juga tahan terhadap suhu panas, bahkan spermatozoa yang dipapar pada suhu 90°C selama 30 menit pun masih mampu membentuk pronukleus (Yanagida *et al.* 1991). Daya tahan inti spermatozoa terhadap proses pengeringan telah dibuktikan pula melalui pengeringbekuan spermatozoa manusia yang dilanjutkan dengan penyimpanan di dalam desikator selama beberapa bulan masih mampu mendukung pembentukan pronukleus (Katayose *et al.* 1992).

Penelitian yang ditujukan untuk menguji kemampuan spermatozoa hasil pengeringbekuan dalam mendukung proses fertilisasi sel telur melalui teknik ICSI, masih terbatas pada hewan percobaan seperti kelinci (Liu *et al.* 2004), tikus (Said 2003), mencit (Wakayama dan Yanagimachi 1998), hamster (Hoshi *et al.* 1994), hewan ternak seperti babi (Kwon *et al.* 2004), sapi (Keskintepe *et al.* 2001) serta manusia (Katayose *et al.* 1992). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan hewan uji yang lain seperti domba untuk mengetahui apakah keberhasilan penerapan metode ini pada hewan percobaan juga dapat diperoleh pada hewan ternak domba.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan dan Penyiapan Spermatozoa

Semen diperoleh dari seekor domba jantan lokal yang dikoleksi dengan menggunakan vagina buatan. Untuk mendapatkan sediaan spermatozoa dalam

bentuk kering diterapkan metode pengeringbekuan yang diadopsi dari Kaneko et al. (2003) dengan sedikit modifikasi. Secara jelas dapat diuraikan sebagai berikut. Spermatozoa terlebih dahulu dibebaskan dari plasmanya dengan menggunakan metode *swim up*. Sebanyak 100 μ l (2×10^9 spermatozoa/ml) semen domba dimasukkan ke dalam *tube* 1.5 ml kemudian ditambahkan secara perlahan-lahan medium pelarut *ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA), *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) atau *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak 1.3 ml dengan pH 8.0. Selanjutnya dilakukan diinkubasi pada suhu 37° C selama 10 menit agar spermatozoa dapat berenang ke permukaan medium. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas *tube* diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 μ l ke dalam *tube* berpenutup ulir 1.5 ml (*Cryo-tube, Greiner*). *Tube* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair hingga proses pengeringbekuan dimulai. Proses pengeringbekuan diawali dengan pemasangan *tube* ke alat pengeringbekuan, selanjutnya mesin dijalankan dan proses pengeringbekuan berjalan hingga terbentuk tepung spermatozoa di dalam *tube* tersebut. *Tube* selanjutnya dilepas dari mesin pengeringbekuan, ditutup rapat, divakum menggunakan spuit 10 ml dan disimpan di dalam lemari es hingga digunakan.

Penyiapan Oosit

Oosit diperoleh dari ovarium yang dikoleksi dari rumah potong hewan. Ovarium selanjutnya dimasukkan ke dalam medium NaCl fisiologis (0.9%) dan dibawa ke laboratorium dalam waktu kurang dari 3 jam hingga proses aspirasi dilakukan. Aspirasi oosit menggunakan spuit 5 ml dan jarum 18G dengan medium

TCM-199 yang ditambah 2% fetal bovine serum (FBS) dan antibiotik. Selanjutnya oosit dikumpulkan dan dicuci beberapa kali di dalam medium maturasi (TCM-199, NaHCO₃ 25 mM, FBS 10%, estrogen 1 mg/ml, FSH 10 μ g/ml, LH 10 μ g/ml dan antibiotik). Semua oosit hasil aspirasi belum matang sehingga harus dimatangkan sesuai dengan prosedur standar maturasi oosit. Proses maturasi dimulai dengan menempatkan oosit ke dalam *spot* (50 μ l) medium maturasi (10-15 sel telur/*spot*). Selanjutnya cawan tersebut dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5%, suhu 37° C selama 24 jam. Evaluasi oosit yang matang dilakukan di bawah mikroskop *inverted* dengan indikator adanya badan kutub pada oosit. Oosit yang mempunyai badan kutub pertama (oosit matang) selanjutnya dipisahkan pada *spot* yang lain sambil menunggu proses ICSI dilakukan

Pelaksanaan intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

Metode ICSI yang digunakan pada penelitian ini merupakan metode mikro fertilisasi yang dikembangkan oleh Budiono (2001) dengan sedikit modifikasi. Secara garis besar prosedur yang dimaksud adalah sebagai berikut. Pertama-tama dibuat *drop* medium ICSI (TCM-199, NaHCO₃ 5 mM, HEPES 20 mM, FBS 5% dan antibiotik) masing-masing sebanyak 5 μ l pada cawan petri. *Drop* pada sisi kiri diisi dengan oosit matang (terdapat badan kutub pertama, PB-1) sebanyak tiga sampai lima oosit yang telah dibebaskan dari kumulus dengan menggunakan enzim hyaluronidase, sedangkan pada *drop* sisi kanan merupakan *drop* yang berisi spermatozoa hasil pengering bekuan. Di dalam pelaksanaan ICSI, spermatozoa terlebih dahulu ditempatkan pada ujung *injection pipet* yang berdiameter kurang dari 10 μ m

sebelum diinjeksikan ke dalam sitoplasma oosit yang telah difiksir dengan menggunakan *holding pipet* yang berdiameter 50-100 μm . Pipet injeksi harus berada pada posisi 90 derajat dari posisi PB-I oosit. Hal ini dimaksudkan agar pada saat pipet injeksi masuk ke dalam sitoplasma oosit, tidak akan merusak inti sel yang berada di dekat PB-I. Selanjutnya, spermatozoa diinjeksikan ke dalam sitoplasma oosit dan pipet injeksi ditarik keluar sitoplasma.

Inkubasi Oosit setelah ICSI

Setelah ICSI dilakukan, oosit dikeluarkan dari *drop* ICSI dan dicuci beberapa kali di dalam medium inkubasi (TCM-199, NaHCO₃ 25 mM, FBS 10% dan antibiotik). Oosit yang telah dicuci dipindahkan ke dalam *drop* medium inkubasi (50 μl), untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5% dan suhu 38°C selama 10 jam.

Evaluasi Oosit setelah ICSI dan Analisis Data

Oosit hasil ICSI yang telah diinkubasi, selanjutnya dievaluasi dengan menggunakan metode pewarnaan *aceto lacmid* (Toyoda dan Chang 1974). Prosedur pewarnaan *aceto lacmid* dapat dijelaskan sebagai berikut. Oosit yang telah diinkubasi selama 24 jam diletakkan di atas obyek gelas dan diberi gelas penutup. Selanjutnya oosit berturut-turut dibilas dengan glutaraldehid 2,5%, difiksasi selama 24 jam di dalam formalin netral 10%, dibilas dengan etanol 95% dan diwarnai dengan *aceto lacmoid* serta dibilas *acetoglycerol* untuk member-sihkan sisa pewarna. Pengamatan oosit hasil pewarnaan dilakukan dibawah mikroskop cahaya dengan lensa objek 40X. Oosit hasil ICSI dikategorikan ke dalam 4 kelompok, yaitu oosit dengan spermatozoa dekonsensasi (DS), oosit dengan satu

pronukleus (1PN), oosit dengan dua pronukleus (2PN) dan oosit tidak teraktivasi.

Data tentang perkembangan spermatozoa dan pembentukan pronukleus setelah ICSI dengan menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan dan spermatozoa segar pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan menggunakan *independent-samples t-test* yang terdapat dalam program SPSS versi 13 dengan taraf pengujian 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji biologis dilakukan baik pada spermatozoa segar maupun spermatozoa hasil pengeringbekuan menggunakan metode ICSI, yaitu memasukkan *spermatozoon* secara mekanik ke dalam sitoplasma sel telur dengan bantuan alat mikromani-pulator di bawah mikroskop *inverted*. Data hasil ICSI yang menjelaskan kejadian aktivasi sel telur yang diindikasikan oleh kemampuan spermatozoa untuk berde-kondensasi dan mendukung pembentuk-an pronukleus setelah ICSI disajikan pada Tabel 1.

Nilai persentase rata-rata sel telur yang teraktivasi setelah diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan dari semua perlakuan berkisar 0 – 60% (rata-rata 36%), sedangkan ICSI menggunakan spermatozoa segar mencapai 70%. Kondisi aktivasi dibagi ke dalam beberapa kategori, yaitu sel telur dengan dua pronukleus (2PN), sel telur dengan satu pronukleus (1PN), sel telur dengan spermatozoa yang terde-kondensasi (DS), dan sel telur dengan spermatozoa yang tetap dalam kondisi terkondensasi (CS) atau sel telur yang tidak teraktivasi.

Data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan yang diinjeksikan ke dalam sel telur domba hanya 2% yang berkembang

Tabel 1 Perkembangan spermatozoa dan pembentukan pronukleus setelah ICSI pada sel telur domba

Sumber spermatozoa	Jumlah oosit yang diinjeksi	Jumlah oosit teraktivasi dengan:				Jumlah oosit tdk teraktivasi (%)
		DS (%)	1PN (%)	2PN (%)	Total (%)	
EDTA-1	20	0 (0) ^a	9 (45) ^c	0 (0) ^a	7 (45) ^c	11 (55) ^c
EDTA-2	20	0 (0) ^a	10 (50) ^c	0 (0) ^a	10 (50) ^c	10 (50) ^c
EDTA-3	20	0 (0) ^a	8 (40) ^c	0 (0) ^a	8 (40) ^c	12 (60) ^c
EGTA-1	20	0 (0) ^a	10 (50) ^c	0 (0) ^a	10 (50) ^c	10 (50) ^c
EGTA-2	20	2 (10) ^b	8 (40) ^c	0 (0) ^a	10 (50) ^c	10 (50) ^c
EGTA-3	20	2 (10) ^b	10 (50) ^c	0 (0) ^a	12 (60) ^{cd}	8 (40) ^{cd}
PBS-1	20	0 (0) ^a	2 (10) ^b	0 (0) ^a	2 (10) ^b	18 (90) ^{bc}
PBS-2	20	0 (0) ^a	4 (20) ^b	0 (0) ^a	4 (20) ^b	16 (80) ^b
PBS-3	20	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	20 (100) ^a
Kontrol	20	0 (0) ^a	8 (40) ^c	6 (30) ^b	14 (70) ^d	6 (30) ^d

Angka yang diikuti huruf *superskript* berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%

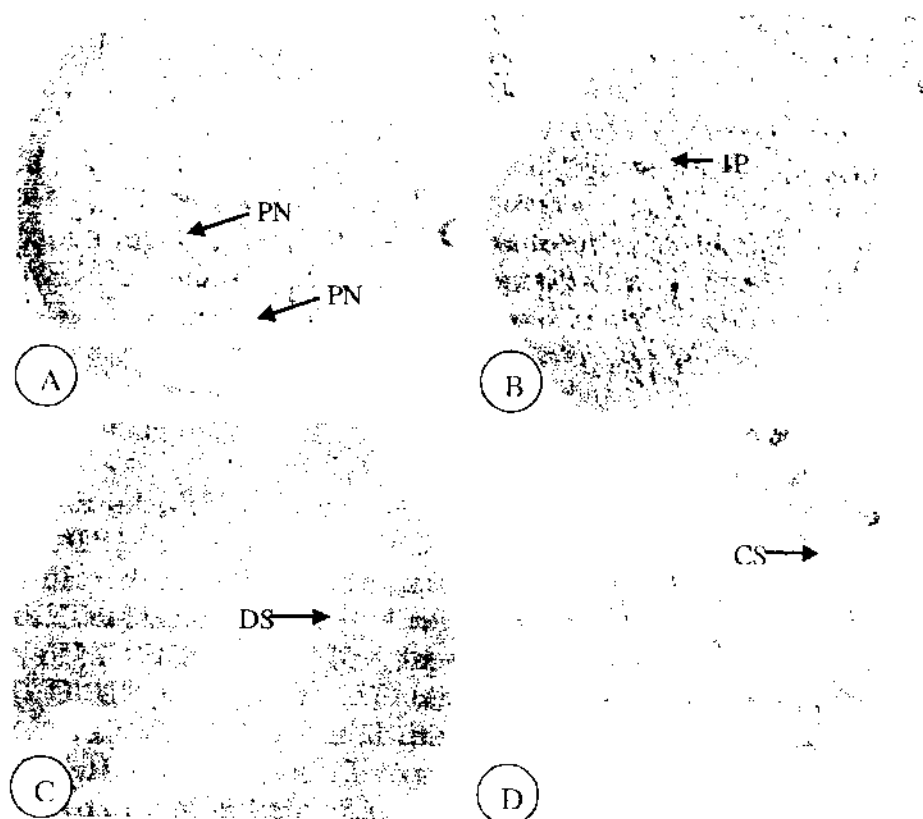
ke tahap dekondensasi dan 34% mampu mendukung pembentukan 1PN, tetapi belum mampu mendukung pembentukan 2PN. Sedangkan spermatozoa segar telah mampu mendukung pembentukan 2PN (30%) dan 1PN (40%) (Gambar 1).

Persentase tertinggi (60%) sel telur yang teraktivasi setelah diinjeksi dengan menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan ditunjukkan oleh perlakuan EGTA-3 yang berbeda nyata lebih tinggi ($P < 0.05$) dibandingkan dengan perlakuan PBS-1 (14%), PBS-2 (20%) dan PBS-3 (0%). Walaupun persentase keberhasilan sel telur teraktivasi yang diinjeksi dengan menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan, khususnya pada perlakuan EGTA-3, tidak berbeda nyata dengan injeksi yang menggunakan spermatozoa segar (kontrol), tetapi secara umum dapat dikatakan bahwa injeksi

dengan menggunakan spermatozoa segar dapat mencapai rata-rata keberhasilan aktivasi sel telur yang nyata lebih besar (70%) dibandingkan dengan injeksi yang menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan.

Secara umum fenomena ini mungkin disebabkan oleh kerusakan faktor paternal selama proses pengeringbekuan sehingga proses fertilisasi menjadi terhambat. Yanagimachi (2001) melaporkan bahwa sentrosom spermatozoa mamalia turut berpartisipasi dalam proses fertilisasi, sedangkan sentrosom spermatozoa hewan rodensia tidak dibutuhkan pada proses fertilisasi karena sentrosom maternal telah cukup melakukan tugas tersebut.

Peristiwa aktivasi sel telur hingga terbentuknya pronukleus betina pada fertilisasi umumnya disebabkan oleh spermatozoa melalui suatu zat yang



Gambar 1 Sel telur dengan 2PN (A), sel telur dengan 1PN (B), sel telur dengan spermatozoa yang terdecondensasi, DS (C), dan sel telur dengan spermatozoa yang tidak berkembang,CS (D)

disebut *oocytes activating factor* (OAF). Zat ini akan merangsang pengeluaran ion kalsium intraseluler melalui *second messenger inositol tri phosphate* (IP3). Peningkatan mobilisasi ion kalsium di dalam sel akan merangsang terjadinya proses meiosis kedua yang menyebabkan keluarnya *polar body* kedua (PB II) dan terbentuknya pronukleus betina. Pada sisi lain, pembentukan pronukleus jantan sangat tergantung pada kondisi sitoplasma sel telur. Spermatozoa yang diinjeksikan ke dalam sel telur yang belum matang atau belum mengalami *germinal vesicle breakdown* (GVBD) tidak akan menyebabkan dekondensasi pada inti spermatozoa (Thadani 1980). Sebaliknya jika spermatozoa dimasukkan ke dalam sel telur yang telah mengalami GVBD, maka akan terjadi dekondensasi

inti spermatozoa dan selanjutnya terjadi pembentukan pronukleus jantan (Balakier dan Tarkowski 1980).

Salah satu faktor yang dicurigai sebagai penyebab proses dekondensasi inti spermatozoa adalah glutathion (GSH) yang terdapat secara alami di dalam sitoplasma sel telur. Glutathion berfungsi mereduksi ikatan sulfhidril protamin pada inti spermatozoa sehingga kromatin terbuka (dekondensasi) dan selanjutnya pembentukan pronukleus jantan dapat berlangsung dengan baik (Mahi dan Yanagimachi 1975). Kegagalan pembentukan pronukleus jantan pada sel telur yang diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan mungkin disebabkan oleh kurang berfungsinya GSH pada sel telur sehingga inti spermatozoa tetap terkondensasi. Hal ini dapat dilihat dari

rendahnya rata-rata angka dekondensasi (2%) pada semua perlakuan yang menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan.

Hal lain yang mungkin menyebabkan tidak terbentuknya pronukleus jantan pada sel telur yang diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan adalah tidak adanya tindakan aktivasi buatan selama masa inkubasi sel telur setelah ICSI. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa pembentukan pronukleus jantan tidak hanya bergantung pada terjadinya GVBD pada sel telur tetapi juga sangat tergantung pada proses aktivasi (Niwa dan Chang 1975; Balakier dan Tarkowski 1980; Perreault *et al.* 1984). Selanjutnya dikatakan bahwa walaupun telah terjadi dekondensasi inti spermatozoa setelah ICSI, tetapi pronukleus jantan tidak akan terbentuk hingga dilakukan aktivasi.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa spermatozoa domba hasil pengeringbekuan mampu mengaktivasi sel telur yang dibuktikan dengan kejadian dekondensasi spermatozoa dan pembentukan 1PN, tetapi belum mampu mendukung pembentukan 2PN. Sedangkan injeksi dengan menggunakan spermatozoa segar telah mampu mendukung pembentukan 2PN dan 1PN.

DAFTAR PUSTAKA

- Balakier HG, Tarkowski AK. 1980. The role of germinal vesicle karyoplasm in the development of male pronucleus in the mouse. *Exp Cell Res* 128:79-85.
- Hoshi K, Yanagida K, Katayose H, Yazawa H. 1994. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote* 2:237-242.
- Kaneko T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 2003. Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol Reprod* 68:136-139.
- Katayose H, Matsuda J, Yanagimachi R. 1992. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol Reprod* 47:277-284.
- Keskintepe L, Hassan A, Khan I, Stice SL. 2001. Bovine embryo development after lyophilized sperm injection. *Theriogenology* 55:505 (Abstract).
- Kwon IK, Park KE, Niwa K. 2004. Activation, pronuclear formation and development *in vitro* of pig oocytes following intracytoplasmic injection of freeze-dried spermatozoa. *Biol Reprod*
- Liu JL et al. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 70:1776-81.
- Mahi CA, Yanagimachi R. 1975. Induction of nuclear decondensation of mammalian spermatozoa *in vitro*. *J Reprod Fertil* 44:293-296.
- Niwa K, Chang MC. 1975. Fertilization of rat eggs *in vitro* at various times before and after ovulation with special reference to fertilization of ovarian oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil* 43:435-451.
- Perreault SD, Wolff RA, Zirkin BR. 1984. The role of disulfide bond reduction during mammalian sperm nuclear decondensation *in vivo*. *Dev Biol* 101:160-167.
- Said S. 2003. Studies on fertilization of rat oocytes by intracytoplasmic sperm injection [Dissertation]. Okayama Japan, The Graduate School of Natural science and Technology Okayama University.

- Saili T, Setiadi MA, Agungpriyono S, Toelihere MR, Boediono A. 2006. Pengaruh pengeringbekuan terhadap perubahan morfologi spermatozoa domba. *Agriplus* 16:107-117.
- Thadani VM. 1980. A study of hetero-specific sperm-egg interaction in the rat, mouse and deer mouse using *in vitro* fertilization and sperm injection. *J Exp Zool* 212:436-453
- Wakayama T, Yanagimachi R. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat Biotech* 16:639-641.
- Watson PF. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. Di dalam: Lemming (ed). *Marshall's Physiology of Reproduction*. Edinburgh : Churchill Livingstone. Hlm 747-869.
- Yanagida K, Yanagimachi R, Perreault SD, Kleinfeld RG. 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol Reprod* 44:440-447.
- Yanagimachi R. 2001. Gamete manipulation for development: new methods for conception. *Reprod Fertil Dev* 13:3-14.