

## Aktivasi Oosit Menggunakan Strontium Klorida setelah Injeksi dengan Spermatozoa Domba Hasil Pengeringkakuan

(*OOCYTE ACTIVATION USING STRONTIUM CHLORIDE FOLLOWING INJECTION  
OF FREEZE-DRIED RAM SPERMATOZOA*)

Takdir Saili<sup>1</sup>, Ita Djuwita<sup>2</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>3</sup>,  
Srihadi Agungpriyono<sup>2</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

<sup>2</sup>Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>3</sup>Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

Email: takdir69@yahoo.com

### ABSTRAK

Salah satu hambatan dalam proses fertilisasi sel telur domba yang diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringkakuan adalah tidak adanya tindakan aktivasi buatan selama masa inkubasi oosit setelah injeksi. Hambatan tersebut terutama yang berkaitan dengan proses pembentukan pronukleus jantan yang merupakan indikator awal keberhasilan fertilisasi. Oleh karena itu pada penelitian ini dikaji kemampuan strontium ( $Sr^{2+}$ ) dalam bentuk strontium klorida ( $SrCl_2$ ) untuk membantu proses aktivasi oosit setelah diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringkakuan melalui metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Metode pewarnaan aceto lacmoid digunakan untuk mengevaluasi kejadian dekonkondensasi dan pembentukan pronukleus pada oosit setelah ICSI. Hasil penelitian mengungkapkan bahwa spermatozoa hasil pengeringkakuan mampu melakukan dekonkondensasi dan mendukung pembentukan satu pronukleus (1PN) walaupun tanpa aktivasi tambahan tetapi gagal membentuk 2PN. Akan tetapi, 40% oosit dengan 2PN dapat diperoleh jika oosit hasil ICSI diinkubasi terlebih dahulu selama 20 menit pada medium yang mengandung  $SrCl_2$  50 mM sebelum diinkubasi lebih lanjut pada medium tanpa strontium selama 10 jam. Hasil ini tidak diperoleh baik pada oosit yang diinjeksi dengan spermatozoa tanpa perlakuan aktivasi tambahan maupun oosit yang tidak diinjeksi tetapi mendapat perlakuan aktivasi tambahan menggunakan strontium klorida 50 mM. Sebagai kesimpulan dapat dikemukakan bahwa spermatozoa hasil pengeringkakuan mampu melakukan dekonkondensasi dan mendukung pembentukan 2PN setelah ICSI dan aktivasi tambahan menggunakan  $SrCl_2$ .

Kata-kata kunci: pengeringkakuan, spermatozoa, ICSI, aktivasi, pronukleus, strontium

### ABSTRACT

One of the factors that inhibit the formation of male pronuclei following injection of freeze-dried ram spermatozoa was the absence of artificial activation during oocyte incubation after the injection. Therefore, in this experiment the ability of strontium chloride ( $SrCl_2$ ) to improve oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was evaluated. Aceto lacmoid staining was used to assess decondensation and pronucleus formation following ICSI. Results of this experiment revealed that freeze-dried spermatozoa had the ability to decondense and to form 1PN following injection into oocytes even without artificial activation, but failed to form 2PN. However, 40% of 2PN oocytes were obtained when the injected oocytes was first incubated for 20 minutes in medium containing 50 mM strontium chloride then subsequently incubated for 10 hours in medium without strontium. On the contrary, the 2PN oocytes were not observed either in injected oocyte neither without artificial activation nor in non-injected oocytes with artificial activation. In conclusion, freeze-dried ram spermatozoa were able to decondense and to support 2PN formation following ICSI and artificial activation using strontium.

Key words: freeze-drying, spermatozoa, ICSI, activation, pronucleus, strontium

## PENDAHULUAN

Spermatozoa hasil pengeringbekuan tidak bersifat motil dan telah mengalami kerusakan membran plasma dan akrosomnya (Liu *et al.*, 2004; Saili *et al.*, 2006) serta perubahan subselulernya (Saili *et al.*, 2009), sehingga untuk tujuan fertilisasi oosit hanya dapat dilakukan melalui metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI). Keberhasilan spermatozoa hasil pengeringbekuan membentuk pronukleus atau berkembang menjadi embrio setelah fertilisasi melalui metode ICSI telah banyak dilaporkan pada hewan seperti mencit (Wakayama dan Yanagimachi, 1998; Kaneko *et al.*, 2003), hamster (Hoshi *et al.*, 1994) dan sapi (Keskintepe *et al.*, 2001). Kelahiran anak mencit (Wakayama *et al.*, 1998) dan kelinci (Liu *et al.*, 2004) bahkan telah diperoleh dari hasil ICSI menggunakan spermatozoa hasil pengeringbekuan. Hal tersebut dapat terjadi karena integritas DNA dalam inti pada spermatozoa hasil pengeringbekuan diperkirakan masih utuh sehingga mampu mendukung proses fertilisasi dengan baik.

Inti spermatozoa memiliki daya tahan terhadap suhu rendah. Hal tersebut telah dibuktikan dengan lahirnya anak hasil inseminasi 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 telah dipapar pada suhu 90°C selama 30 menit pun masih mampu membentuk pronukleus (Yanagida *et al.*, 1991). Daya tahan inti spermatozoa manusia terhadap proses pengeringbekuan dan penyimpanan di dalam desikator selama beberapa bulan telah dibuktikan dan spermatozoa tersebut masih mampu mendukung pembentukan pronukleus (Katayose *et al.*, 1992).

Penelitian yang ditujukan untuk menguji kemampuan spermatozoa hasil pengeringbekuan dalam mendukung proses fertilisasi oosit melalui metode ICSI masih terbatas pada hewan percobaan seperti kelinci (Liu *et al.*, 2004), tikus (Said *et al.*, 2003), mencit (Wakayama dan Yanagimachi, 1998), hamster (Hoshi *et al.*, 1994) dan hewan ternak seperti babi (Kwon *et al.*, 2004) dan sapi (Keskintepe *et al.*, 2001) serta manusia (Katayose *et al.*, 1992) sehingga perlu diperluas ke hewan lain sebagai bahan komparasi. Sejauh ini penelitian serupa pada domba belum pernah dilaporkan.

Penggunaan strontium sebagai agen partenogenesis telah diterapkan pada oosit mencit (Otaegui *et al.*, 1999), oosit tikus (Tomashov-Matar *et al.*, 2005) dan oosit sapi (Meo *et al.*, 2005). Lebih lanjut Tomashov-Matar *et al.*, (2005) melaporkan bahwa strontium klorida (SrCl<sub>2</sub>) dapat mengaktifasi osilasi kalsium (Ca<sup>2+</sup>) internal oosit tikus melalui reseptor *inositol triphosphate* (IP<sub>3</sub>). Proses aktivasi oosit oleh strontium klorida pada tikus memberikan hasil yang mirip dengan aktivasi yang disebabkan oleh spermatozoa.

Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji spermatozoa domba hasil pengeringbekuan mengalami dekondensasi dan mendukung pembentukan pronukleus setelah diinjeksikan ke dalam oosit melalui metode ICSI. Selain itu, juga akan diuji kemampuan strontium klorida untuk mengaktifasi sel telur domba setelah ICSI.

## METODE PENELITIAN

### Penyiapan Spermatozoa

Spermatozoa yang digunakan pada penelitian ini adalah spermatozoa domba hasil pengeringbekuan. Metode pengeringbekuan spermatozoa yang digunakan diadopsi dari Kaneko *et al.*, (2003) dengan sedikit modifikasi. Secara garis besar dapat diuraikan sebagai berikut. Sejumlah 50 µl (3 x 10<sup>9</sup> spermatozoa/ml) semen domba dimasukkan secara perlahan ke bagian dasar tube 1,5 ml kemudian ditambahkan medium pelarut *Ethylene Glycol Tetra-acetic Acid* (EGTA) Tris-HCl dengan pH 8,0 sebanyak 1,3 ml. Selanjutnya campuran semen tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit agar spermatozoa terpisah dari kelompoknya dan bergerak ke arah permukaan larutan. Hal tersebut sekaligus merupakan salah satu bentuk seleksi spermatozoa. Spermatozoa yang mampu mencapai bagian permukaan medium merupakan spermatozoa dengan motilitas terbaik. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas *tube* diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 µl ke dalam *tube* berpenutup ulir 1,5 ml (*Cryo-tube*, Greiner, Jerman). *Tube* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam kotak yang berisi nitrogen cair dan dibiarkan hingga proses pengeringbekuan dimulai. Proses pengeringbekuan diawali dengan memasang *tube* pada *holder* alat pengeringbekuan. Selanjutnya mesin

dijalankan dan proses pengeringbekuan berlangsung hingga terbentuk tepung spermatozoa di dalam tube tersebut. Tube selanjutnya dilepas dari mesin pengeringbekuan, ditutup rapat, divakum dengan jalan menghisap udara di dalam tube dengan menggunakan spuit 10 ml. Tube yang mengandung spermatozoa hasil pengeringbekuan tersebut selanjutnya disimpan di dalam lemari es sampai digunakan.

### Penyiapan Oosit

Ovarium yang diperoleh dari rumah potong hewan dimasukkan ke dalam medium NaCl fisiologis (0,9%) yang mengandung antibiotik untuk selanjutnya dibawa ke laboratorium dalam waktu kurang dari 3 jam hingga proses koleksi dilakukan. Koleksi oosit dilakukan dengan cara *slicing*, yaitu menyayat secara horisontal dan vertikal permukaan ovarium untuk mengeluarkan oosit yang berada di dalam folikel. Oosit selanjutnya ditampung di dalam medium koleksi (*phosphate buffered saline* [PBS], *fetal bovine serum* [FBS] 2% dan antibiotik) dan dilakukan seleksi di bawah mikroskop cahaya untuk mendapatkan oosit yang layak maturasi. Oosit yang dipilih adalah oosit yang mempunyai sitoplasma berwarna gelap dan sel-sel kumulus yang kompak. Sebelum dimasukkan ke dalam inkubator untuk proses maturasi, oosit dicuci beberapa kali di dalam medium maturasi (*tissue culture medium* [TCM]-199, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, FBS 10%, estrogen 1 mg/ml, FSH 10 µg/ml, LH 10 µg/ml dan antibiotik). Oosit yang telah bersih selanjutnya dipindahkan ke dalam *drop* (50 µl) medium maturasi (10-15 oosit/*drop*) dan dimasukkan ke dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5%, suhu 38°C selama 24 jam. Oosit yang dikategorikan matang adalah oosit yang sel-sel kumulusnya berkembang dan mengeluarkan *polar body* pertama (PB-I). Pengamatan dilakukan di bawah mikroskop *inverted* (Nikon) dengan lensa objektif 20X.

### Pelaksanaan ICSI

Metode ICSI yang digunakan pada penelitian ini merupakan metode mikro fertilisasi yang dikembangkan oleh Boediono (2001) dengan sedikit modifikasi. Secara garis besar prosedur yang dimaksud adalah sebagai berikut. Spermatozoa yang digunakan terlebih dahulu dibersihkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 500 g selama 10 menit. Khusus spermatozoa segar juga dilakukan seleksi

spermatozoa dengan cara proses *swim up*. Hal tersebut dilakukan dengan cara menempatkan 50 µl (3 x 10<sup>9</sup> spermatozoa/ml) semen domba ke bagian dasar *tube* 1,5 ml kemudian ditambahkan medium PBS pH 7,2 sebanyak 1,3 ml. Selanjutnya campuran semen tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit agar spermatozoa terpisah dari kelompoknya dan bergerak ke arah permukaan larutan. Selanjutnya dibuat *drop* medium ICSI (TCM-199, NaHCO<sub>3</sub> 5 mM, *hydroxy ethyl piperazine ethane sulphonic acid* (HEPES) 20 mM, FBS 5% dan antibiotik) masing-masing sebanyak 5 µl pada cawan petri. *Drop* pada sisi kiri diisi dengan oosit matang (terdapat badan kutub pertama, PB-I) sebanyak tiga sampai lima oosit yang telah dibebaskan dari kumulus dengan menggunakan enzim *hyaluronidase*, sedangkan *drop* pada sisi kanan merupakan *drop* yang berisi spermatozoa. Pada pelaksanaan ICSI, spermatozoa terlebih dahulu ditangkap dengan menggunakan *injection pipet* yang berdiameter kurang dari 10 µm, selanjutnya spermatozoa 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 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, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, FBS 10% dan antibiotik). Oosit yang telah dicuci terlebih dahulu diinkubasi di dalam medium yang mengandung strontium klorida 50 mM selama 20 menit kemudian dipindahkan ke dalam *drop* inkubasi tanpa strontium klorida (50 µl) untuk diinkubasi selama 10 jam pada kondisi CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 38°C.

### Evaluasi Oosit setelah ICSI

Oosit yang telah mengalami ICSI dan telah diinkubasi, selanjutnya dievaluasi dengan menggunakan metode pewarnaan *aceto lacmoid* (Toyoda dan Chang 1974). Prosedur pewarnaan *aceto lacmoid* dapat dijelaskan sebagai berikut. Oosit yang telah diinkubasi selama 24 jam diletakkan di atas gelas objek dan diberi gelas penutup. Selanjutnya oosit berturut-turut dibilas

dengan *glutaraldehyde* 2,5%, difiksasi selama 24 jam di dalam formalin netral 10%, dibilas dengan etanol 95% dan diwarnai dengan *aceto lacmoid* serta dibilas *acetoglycerol* untuk membersihkan sisa pewarna. Pengamatan oosit hasil pewarnaan dilakukan di bawah mikroskop cahaya dengan lensa objektif 40X. Oosit setelah mengalami ICSI dikategorikan ke dalam empat kelompok, yaitu oosit dengan spermatozoa terdekondensasi (DS), oosit dengan satu pronukleus (1PN), oosit dengan dua pronukleus (2PN), dan oosit tidak teraktivasi.

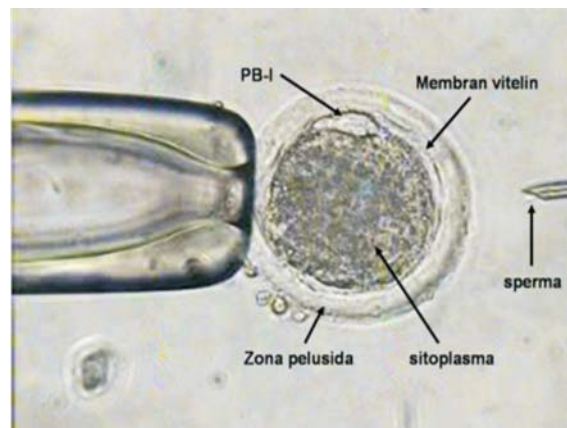
**Rancangan Percobaan dan Analisis Data**

Percobaan dilakukan untuk mengkaji pengaruh aktivator strontium klorida guna mendukung proses aktivasi oosit setelah ICSI. Peubah yang diamati pada penelitian ini adalah oosit dengan spermatozoa terdekondensasi (DS), oosit dengan satu pronukleus (1PN), oosit dengan dua pronukleus (2PN), dan oosit tidak teraktivasi. Dekondensasi spermatozoa merupakan indikator utama untuk menunjukkan kemampuan spermatozoa dalam memulai tahap awal proses fertilisasi.

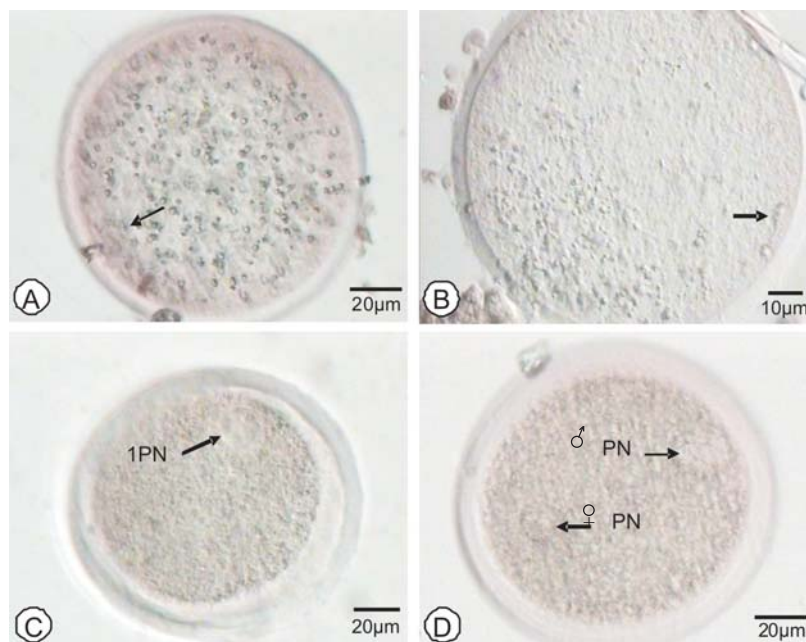
Sumber spermatozoa yang digunakan pada ICSI adalah spermatozoa domba hasil pengeringbekuan yang telah disimpan selama sembilan bulan. Selanjutnya data dikumpulkan dan dianalisis menggunakan program SPSS versi 13 dengan taraf pengujian 5%.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Metode ICSI telah menjadi teknologi reproduksi berbantuan pilihan dalam mengatasi masalah infertilitas terutama pada manusia. Melalui metode ICSI (Gambar 1) yang menggunakan alat mikromanipulator yang terpasang pada mikroskop maka spermatozoa dapat dimasukkan secara langsung ke dalam sitoplasma oosit sehingga beberapa hambatan dalam fertilisasi normal dapat dilewati.



Gambar 1. Pelaksanaan ICSI pada sel telur domba



Gambar 2. Oosit domba hasil ICSI dan metode pewarnaan *aceto lacmoid* (Toyoda dan Chang 1974). Oosit tidak teraktivasi dengan spermatozoa utuh, tanda panah (A), oosit dengan spermatozoa yang terdekondensasi, tanda panah (B), oosit dengan 1PN, tanda panah (C) dan oosit dengan 2PN, tanda panah (D)

Oosit yang telah diinjeksi selanjutnya mengalami aktivasi hingga terbentuk pronukleus betina dan jantan sebagai indikator awal kejadian fertilisasi. Kondisi aktivasi dibagi ke dalam beberapa kategori, yaitu oosit dengan spermatozoa yang terdekondensasi (DS), oosit dengan satu pronukleus (1PN), oosit dengan dua pronukleus (2PN), dan oosit yang tidak teraktivasi (Gambar 2).

Hasil penelitian awal mengindikasikan bahwa aktivasi yang dilakukan oleh spermatozoa hasil pengeringbekuan belum mampu mendukung pembentukan 2PN sehingga dibutuhkan aktivator eksternal. Proses aktivasi oosit secara buatan dapat dilakukan dengan berbagai macam cara, antara lain dengan arus listrik atau dengan pemberian zat kimia seperti etanol, kalsium ionofor, magnesium klorida atau strontium klorida. Pada percobaan ini digunakan strontium klorida (SrCl<sub>2</sub>, Sigma) sebanyak 50 mM untuk mendukung proses aktivasi oosit setelah ICSI. Hasil aktivasi oosit setelah ICSI selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

Nilai persentase rata-rata oosit yang teraktivasi setelah diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan dan diaktivasi dengan menggunakan SrCl<sub>2</sub> 50 mM dapat mencapai 76%. Hasil ini hampir sama dengan capaian yang diperoleh pada ICSI menggunakan spermatozoa segar sebesar 84% pada penelitian sebelumnya (Saili, 2006), tetapi lebih tinggi dibandingkan dengan oosit yang hanya diinjeksi dengan spermatozoa tanpa perlakuan aktivasi (60%) walaupun tidak berbeda nyata secara statistika (P>0,05). Namun demikian, aktivasi oosit yang disebabkan kombinasi antara spermatozoa dan SrCl<sub>2</sub> nyata lebih tinggi dibandingkan dengan oosit yang hanya diaktivasi dengan SrCl<sub>2</sub> (40%). Walaupun oosit pada semua perlakuan pada umumnya mampu

berkembang mencapai tahap 1PN dengan kisaran keberhasilan 36%-48%, tetapi tahap 2PN hanya dapat dicapai oleh oosit setelah diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan dan diaktivasi dengan menggunakan SrCl<sub>2</sub> 50 mM (40%). Tahap 2PN tidak diperoleh baik pada oosit yang diinjeksi dengan spermatozoa saja tanpa perlakuan aktivasi (0%) maupun oosit yang hanya mengalami aktivasi tanpa injeksi spermatozoa (0%). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan SrCl<sub>2</sub> dapat mengaktivasi oosit setelah ICSI.

Zhang *et al.*, (2005) melaporkan bahwa aktivasi oosit dapat dilakukan secara buatan menggunakan zat kimia seperti strontium (Sr<sup>2+</sup>) yang merupakan agen partenogenesis pada oosit matang. Strontium menginduksi munculnya kalsium (Ca<sup>2+</sup>) pada oosit matang. Mekanisme kerja Sr<sup>2+</sup> dimediasi oleh reseptor inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>). Hal tersebut dapat dibuktikan dengan penambahan 100 nM IP<sub>3</sub> akan meningkatkan osilasi Ca<sup>2+</sup> intraseluler. Akan tetapi peningkatan osilasi Ca<sup>2+</sup> tersebut akan terhenti secara total setelah dilakukan penambahan heparin sebanyak 120 µM. Heparin merupakan zat kimia yang bersifat antagonis terhadap kerja reseptor IP<sub>3</sub>. Selanjutnya osilasi Ca<sup>2+</sup> oleh Sr<sup>2+</sup> membutuhkan aktivasi yang diperankan oleh fosfolipase C (PLC) yang bekerja sinergis dengan IP<sub>3</sub>.

Pada mamalia, spermatozoa mengaktivasi oosit dengan memicu osilasi Ca<sup>2+</sup> dalam waktu lama pada sitoplasma oosit. Berbagai bukti menunjukkan bahwa osilasi Ca<sup>2+</sup> yang diinduksi spermatozoa dipicu oleh protein spermatozoa yang berdifusi ke dalam sitoplasma oosit setelah fusi membran gamet. Protein tersebut belum diketahui, namun diduga berfungsi sama seperti PLC. Protein tersebut diduga memobilisasi Ca<sup>2+</sup> yang dilepaskan dari intraseluler melalui

Tabel 1. Dekondensasi spermatozoa hasil pengeringbekuan dan pembentukan pronukleus setelah ICSI dan aktivasi menggunakan strontium klorida pada oosit domba

Perlakuan	Σ oosit yang diinjeksi	Σ oosit teraktivasi (%):				Σ oosit tdk teraktivasi (%)
		DS	1PN	2PN	Total	
Spermatozoa + strontium	25	0 (0) <sup>a</sup>	9 (36) <sup>a</sup>	10 (40) <sup>b</sup>	19 (76) <sup>b</sup>	6 (24) <sup>b</sup>
Spermatozoa	25	3 (12) <sup>a</sup>	12 (48) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	15 (60) <sup>ab</sup>	10 (40) <sup>ab</sup>
Strontium	25	0 (0) <sup>a</sup>	10 (40) <sup>a</sup>	0 (0) <sup>a</sup>	10 (40) <sup>a</sup>	15 (60) <sup>a</sup>

Angka yang diikuti huruf *superskript* berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata pada taraf uji 5%. DS=decondensed spermatozoa; 1PN=satu pronukleus; 2PN=dua pronukleus.

reseptor  $IP_3$  sebab dengan menghilangkan fungsi reseptor  $IP_3$ , pengeluaran  $Ca^{2+}$  yang disebabkan oleh spermatozoa menjadi terhambat total. Pengamanan protein tersebut hingga saat fertilisasi membutuhkan influks  $Ca^{2+}$  yang tergantung pada adanya fungsi mesin maternal. Osilasi  $Ca^{2+}$  terjadi secara bergelombang selama beberapa jam dan berhenti menjelang pembentukan pronukleus. Munculnya  $Ca^{2+}$  pertama kali dan selanjutnya sangat penting untuk proses aktivasi oosit, sedangkan osilasi yang panjang berguna pada perkembangan awal embrio seperti pembentukan pronukleus (Zhang *et al.*, 2005).

Aktivasi oosit setelah ICSI sampai dengan tahap pembentukan 2PN masih tergolong rendah jika dibandingkan dengan hasil ICSI oleh beberapa peneliti pada hewan yang berbeda, seperti pada babi yang mencapai 82% (Kwon *et al.*, 2004) dan sapi mencapai 56% (Keskintepe *et al.*, 2002). Hal tersebut 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.

Hal lain yang mungkin menyebabkan tidak terbentuknya pronukleus jantan pada oosit yang diinjeksi dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan adalah tidak adanya tindakan aktivasi buatan selama masa inkubasi oosit setelah ICSI. Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa pembentukan pronukleus jantan tidak hanya bergantung pada terjadinya *germinal vessicle breakdown* (GVBD) pada oosit 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.

### SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa spermatozoa hasil pengeringbekuan mampu melakukan dekondensasi dan mendukung pembentukan 1PN walaupun tanpa aktivasi tambahan. Sedangkan

aktivasi tambahan berupa strontium klorida 50 mM dapat memberi dukungan yang nyata terhadap pembentukan 2PN pada oosit domba yang diinjeksi melalui metode ICSI dengan spermatozoa hasil pengeringbekuan.

### SARAN

Pembuktian kemampuan spermatozoa domba hasil pengeringbekuan untuk membuahi sel telur sampai dengan terbentuknya zigot dan embrio masih sangat sulit dicapai, sehingga dibutuhkan penelitian lebih lanjut dengan konsentrasi utama pada perbaikan kondisi sistem kultur setelah ICSI.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Embriologi, FKH IPB yang telah memberikan kesempatan kepada penulis melaksanakan penelitian. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada ketua tim Penelitian Hibah Pascasarjana IPB atas bantuan dana sehingga penelitian ini bisa berjalan dengan baik.

### 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.
- Boediono A. 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improves early development of microfertilized goat oocytes. *Reprotech* 1 (1):29-34.
- 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* 71:1430-1436.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R, Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X. 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod* 70:1776-81.
- Meo SC, Yamazaki W, Leal CL, de Oliveira JA, Garcia JM. 2005. Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology* 63:2089-2102.
- 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.
- Otaegui PJ, O'Neill GT, Wilmut I. 1999. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by exposure to strontium as a source of cytoplasts for nuclear transfer. *Cloning* 1:111-117.
- 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, Saili T, Tappa B. 2003. Pengaktifan dan pembuahan oosit tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati* 10:96-99.
- Saili T, Setiadi MA, Agungpriyono S, Toelihere MR, Boediono A. 2006. Pengaruh pengeringbekuan terhadap perubahan morfologi spermatozoa domba. *Agriplus*, 16:107-117.
- Saili T. 2006. Morfologi dan integritas DNA spermatozoa domba setelah diawetkan dengan metode pengeringbekuan. Disertasi Bogor. Institut Pertanian Bogor. Hal. 79.
- Saili T, Adnyana IKM, Setiadi MA, Agungpriyono S, and Boediono A. 2009. Changes on viability and subcellular of ram spermatozoa following freeze-drying. *Jurnal Veteriner* 10(4):213-218.
- 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.
- Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A, Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. 2005. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction* 130:467-474.
- Toyoda Y, Chang MC. 1974. Fertilization of rat eggs *in vitro* by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. *J Reprod Fertil* 36:9-22.
- Wakayama T, Whittingham DG, Yanagimachi R. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J Reprod Fertil* 112:11-17.
- 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.
- Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ. 2005. Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Human Reprod* 20:3053-3061.