

# PRODUKSI EMBRIO KUCING SECARA *IN VITRO* DARI SPERMATOZOA HASIL PRESERVASI MELALUI FERTILISASI MIKRO

## *In Vitro Development of Cat Embryos from Preserved Sperm by Micro Fertilization*

Kartini Eriani<sup>1</sup>, Yuhara Sukra<sup>2</sup>, Arief Boediono<sup>2</sup>, Ita Djuwita<sup>2</sup>, dan Sony Heru Sumarsono<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

<sup>2</sup>Bagian Anatomi, Histologi, dan Embriologi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, Bogor

<sup>3</sup>Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung, Bandung

E-mail: kartini.eriani@gmail.com

### ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui motilitas dan kemampuan memfertilisasi sperma kucing yang berasal dari epididimis yang disimpan pada suhu 4° C. Epididimis disimpan dalam media *phosphate buffer saline* (PBS) pada suhu 4° C selama 1, 3, dan 6 hari. Viabilitas spermatozoa diamati dengan pewarnaan *hoechst-propidium iodine*. Fungsi biologis spermatozoa dievaluasi melalui teknik kultur *in vitro* dengan fertilisasi mikro dan perkembangan embrio di dalam media kultur CR1aa. Hasil penelitian menunjukkan persentase spermatozoa hidup pada hari ke-1, 3, dan 6 penyimpanan masing-masing adalah 81,0; 71,7; dan 70,7% (duktus deferens), 84,0; 81,2; dan 63,2% (kauda epididimis), 84,0%; 75,0; dan 74,7% (korpus epididimis). Persentase pronukleus (PN) yang didapat dengan teknik *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI) menggunakan spermatozoa epididimis pada hari ke-1, 3, dan 6 hari penyimpanan masing-masing adalah 8,0; 10,0; dan 5,9%. Preservasi epididimis pada suhu 4° C dalam PBS dapat digunakan untuk fertilisasi dan menghasilkan embrio kucing secara *in vitro*.

Kata kunci: gamet, preservation (penyimpanan), fertilisasi *in vitro*, *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI)

### ABSTRACT

The purpose of this study was to determine how long cat's spermatozoa remained motile when maintained in epididymis stored at 4° C. Epididymis was preserved immediately in phosphate buffer saline at 4° C for 1, 3, and 6 days. The observation on sperm viability after preservation were identified through Hoechst-Propidium Iodine. The sperm biological function was evaluated using in vitro culture technique for micro fertilization and embryonic development rate in CR1aa medium culture. The results of the study showed that the live sperm percentage of sperm collected from ductus deferens, cauda, and corpus epididymis from 1, 3, and 6 days of preservation times were 81.0, 71.7, and 70.7%; 84.0, 81.2, and 63.2%; 84.0, 75.0, and 74.7%, respectively. The percentage of pronucleus produced from ICSI using epididymal sperm after preserved 1, 3, and 6 days resulted in 8.0, 10.0, and 5.9%, respectively. In conclusion, preservation of epididymis at 4° C in PBS can be used to IVF and in vitro production of cat embryos.

Key words: gamet, preservation, in vitro fertilization, *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI)

### PENDAHULUAN

Reproduksi sangat penting bagi kelangsungan hidup suatu spesies karena setiap individu mempunyai jangka waktu kehidupan terbatas dan hanya dengan reproduksi kelangsungan spesies dapat terjaga. Pada beberapa spesies tertentu, khususnya hewan liar, terdapat kendala berupa gangguan alam atau akibat campur tangan manusia yang menyebabkan terganggunya reproduksi hewan tersebut. Hal ini menyebabkan populasi hewan tersebut semakin berkurang bahkan dikhawatirkan suatu saat akan punah. Salah satu spesies yang dianggap hampir punah adalah dari famili *felidae*, baik *big felids* (*panthera*) maupun *small felids* (*felis*).

Beberapa kucing liar yang diduga keberadaannya hampir punah yaitu *Panthera tigris sumatrensis* (harimau Sumatra), *Felis marmorata* (kucing kuwuk), *Felis temminckii* (kucing emas), *Pardofelis nebulosa* (harimau dahan), *Prionailurus planiceps* (kucing dampak), dan *Felis bengalensis* (kucing batu) (Unit Manajemen Leuser). Pope (2000) mengatakan lebih

dari 36 spesies kucing liar diklasifikasikan terancam punah.

Kematian hewan langka di daerah yang jauh dari laboratorium menyebabkan sumber material genetik berupa spermatozoa dan oosit tidak dapat diselamatkan. Dalam upaya penyelamatan material genetik, preservasi merupakan salah satu alternatif yang dapat digunakan. Teknik ini mudah dilakukan karena hanya membutuhkan larutan fisiologis seperti NaCl fisiologis atau *phosphate buffer saline* (PBS) yang dipertahankan pada suhu 4-5° C. Pada percobaan ini dilakukan preservasi epididimis dan ovarium di dalam larutan PBS untuk mengetahui kemampuan adaptasi epididimis dalam mempertahankan daya hidup spermatozoa dan oosit. Diharapkan kerusakan yang disebabkan oleh kendala jarak dan waktu dapat diminimalkan.

Untuk pengujian viabilitas spermatozoa setelah preservasi epididimis dilakukan dengan fertilisasi mikro. Rendahnya tingkat fertilisasi dan tingginya kejadian polispermia, maka perlu dilakukan teknik fertilisasi menggunakan spermatozoa tunggal melalui

teknik *intacytoplasmic sperm injection* (ICSI). Dilaporkan bahwa sebagian besar keluarga *felidae* memiliki kualitas spermatozoa yang jelek (Farstad, 2000) dan tingkat abnormalitas spermatozoa ejakulat mencapai >60% (Penfold *et al.*, 2003). Oleh karena itu metode ICSI dipilih sebagai salah satu alternatif fertilisasi mikro.

## MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Embriologi dan Laboratorium Anatomi, Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Penelitian menggunakan testis dan ovarium kucing berusia 2-3 tahun, dengan bobot 2-3,5 kg. Pengambilan testis melalui bedah kastrasi dan ovariektomi.

### Preservasi dan Koleksi Spermatozoa dari Duktus Deferens dan Epididimis

Epididimis dan duktus deferens dipreservasi dalam medium PBS dan disimpan di dalam refrigerator bersuhu 4° C. Viabilitas spermatozoa diamati pada hari ke-1 (1H), hari ke-3 (3H), dan hari ke-6 (6H). Spermatozoa diaspirasi dari kauda dan korpus epididimis sebanyak 10x menggunakan jarum ukuran 26 G yang dihubungkan dengan jarum 1 ml berisi 0,2 ml mPBS. Selanjutnya dimasukkan ke dalam vial dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 g selama 5 menit. Bagian duktus deferens dipotong 2 cm dan dilakukan *flushing* menggunakan spuit yang berisi 0,2 ml mPBS. Larutan *flushing* dimasukkan ke dalam vial dan disentrifugasi 500 g selama 5 menit. Viabilitas spermatozoa dilihat dari persentase spermatozoa hidup yang dideteksi dengan pewarnaan *hoechst-propidium iodine* (Djuwita, 2001).

### Koleksi Oosit

Koleksi oosit dilakukan dengan *slicing*, yaitu menyayat bagian korteks ovarium dengan silet di dalam cawan petri yang berisi mPBS. Kriteria penilaian kualitas oosit ditentukan berdasarkan penilaian visual dari kekompakan dan banyaknya sel granulosa serta homogenitas sitoplasma. Oosit kualitas A memiliki sitoplasma homogen dan dikelilingi 5-10 lapis sel granulosa yang utuh. Oosit kualitas B memiliki sitoplasma homogen dan dikelilingi 3-5 lapis sel granulosa. Oosit kualitas C sitoplasma homogen dan sel kumulus 1-2 lapis. Sedangkan oosit kualitas D sitoplasma homogen, tanpa kumulus. Oosit yang digunakan adalah oosit yang berkualitas A dan B (Carolan *et al.*, 1994).

### Pematangan Oosit

Oosit hasil koleksi dari ovarium dicuci tiga kali dengan menggunakan medium CR1aa (Rosenkrans dan First, 1994), yang ditambah dengan *fetal bovine serum* (FBS) 10% (v/v), *bovine serum albumin* (BSA) 0,03%, *follicle stimulating hormone* (FSH) 10 µg/ml, *luteinizing hormone* (LH) 20 µg/ml, estradiol 1 µg/ml dan antibiotik (10.000 IU penisilin/ml dan 10 mg streptomisin/ml). Sebanyak 15 oosit kualitas A dan B dimasukkan di dalam 50 µl medium tetes CR1aa dan ditutup dengan mineral *oil*. Oosit dikultur dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5% pada suhu 37° C selama 24 jam.

### Fertilisasi Mikro (ICSI = *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*)

Metode fertilisasi mikro yang digunakan yaitu ICSI yang dikembangkan oleh Boediono (2001). Preparasi alat injeksi mikromanipulasi seperti yang dilakukan Palermo *et al.* (1996). Oosit yang memiliki badan kutub, dibersihkan dari sel kumulus dan dimasukkan ke dalam medium tetes yang berukuran 5-10 µl. Spermatozoa yang digunakan untuk ICSI sama dengan perlakuan spermatozoa untuk fertilisasi *in vitro*, tanpa *caffeine* dan heparin. Spermatozoa dimasukkan ke dalam 100 µl medium tetes. Spermatozoa dari medium tetes besar selanjutnya bergerak menuju medium tetes kecil (7 µl) (*side migration*). Spermatozoa yang bergerak hasil koleksi dari testis preservasi 1H, 3H, dan 6H, diimmobilisasi dengan melakukan pemotongan ekor. Oosit pada medium tetes diatur dengan posisi pipet *holding* (diameter 100 µl) memfiksir oosit dan pipet injeksi (diameter 10 µl) menginjeksi spermatozoa dengan sudut kemiringan 5° C.

Tingkat fertilisasi diamati dengan pewarnaan *aceto orcein*, dinyatakan dibuahi jika memiliki dua buah PN. Persentase fertilisasi dihitung dari jumlah oosit yang memiliki dua buah PN per jumlah oosit yang diinseminasi.

### Analisis Data

Data dianalisis dengan rancangan acak lengkap, masing-masing dengan tiga ulangan dan selanjutnya dianalisis dengan analisis varian. Data hasil pengamatan berupa persentase fertilisasi dan perkembangan embrio jika ada perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey-Kramer HSD (Steel dan Torrie, 1991).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Viabilitas Spermatozoa

Spermatozoa masih dapat bertahan hidup pada hari ke-6 (6H) baik yang bersumber dari duktus deferens,

**Tabel 1.** Persentase spermatozoa yang hidup setelah preservasi

Sumber spermatozoa	Spermatozoa hidup pada hari ke (%)		
	1H	3H	6H
Duktus deferens	81,0 <sup>a</sup>	71,7 <sup>a</sup>	70,7 <sup>a</sup>
Kauda epididimis	84,0 <sup>a</sup>	81,2 <sup>a</sup>	63,2 <sup>ab</sup>
Korpus epididimis	84,0 <sup>a</sup>	75,0 <sup>a</sup>	74,7 <sup>a</sup>

<sup>a, ab</sup> Superskrip yang berbeda pada baris yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

kauda epididimis, dan korpus epididimis seperti yang disajikan pada Tabel 1. Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa dengan perlakuan preservasi sampai 6H masih dapat digunakan untuk terjadinya fertilisasi dengan teknik ICSI karena pada teknik ICSI hanya dibutuhkan satu spermatozoa untuk membuahi satu sel telur.

Persentase spermatozoa hidup yang lebih rendah pada preservasi hari-6 yaitu 63,2; 70,7; dan 74,7% berturut-turut pada duktus deferens; kauda; dan korpus epididimis menunjukkan bahwa akibat preservasi sampai hari ke-6 kerusakan sel tidak dapat lagi dihindari karena adanya tekanan oksidatif yang menyebabkan produksi senyawa oksigen reaktif (ROS) yang berlebihan. Menurut Duru *et al.* (2000) ROS menyebabkan peroksidasi lipid pada membran plasma spermatozoa, yang akhirnya menimbulkan kegagalan fungsi spermatozoa yaitu hilangnya kemampuan untuk fertilisasi.

Menurut Aitken *et al.* (1989) struktur membran plasma spermatozoa, terutama mengandung asam dokosaheksanoat, yaitu asam lemak tak jenuh jamak (ALTJJ) atau *polyunsaturated fatty acids*, ikatan rangkap C=H sangat lemah, sehingga rentan terhadap proses peroksidasi, dan kemudian melepaskan atom hidrogen membentuk peroksida lipid. Pada manusia, spermatozoa sangat rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh peroksidasi karena mengandung konsentrasi ALTJJ yang cukup tinggi sehingga tidak mampu untuk memperbaiki dan akan merupakan sumber senyawa oksigen reaktif yang baru terutama anion superoksida dan hidrogen peroksida. Walaupun kehadiran senyawa oksigen reaktif hanya sesaat, tetapi kerusakan yang ditimbulkan pada spermatozoa cukup berarti terutama yang disebabkan oleh radikal hidroksil sehingga akan mengganggu fungsi spermatozoa.

Kerusakan peroksidasi pada spermatozoa dapat terjadi karena enzim pertahanan, seperti peroksida dismutase dan glutation peroksidase dalam sitoplasma spermatozoa tidak banyak. Diketahui, spermatozoa hanya mengandung sedikit sitoplasma sehingga jumlah enzim yang dibutuhkan untuk menghambat terbentuknya oksigen reaktif, yang berasal dari spermatozoa itu sendiri, tidak cukup efektif. Lokasi enzim pertahanan ini banyak terdapat di bagian tengah spermatozoa (*midpiece*), sedangkan di bagian ekor dan di bagian akrosom kurang, sehingga membran lipid di bagian ekor dan akrosom (kepala) kurang dilindungi (Aitken *et al.*, 1989).

Menurut Dandekar *et al.* (2002) yang disitasi Soeradi (2004), spermatozoa mamalia umumnya kaya ALTJJ

dan sangat rentan terhadap serangan senyawa oksigen reaktif dan ion peroksida lipid dari membran spermatozoa. Dalam keadaan normal, ada keseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan. Jika keseimbangan itu terganggu, maka akan terjadi kerusakan pada jaringan sel. Azis *et al.* (2004) melaporkan bahwa ada korelasi negatif yang bermakna antara produksi radikal bebas dan spermatozoa dengan morfologi normal. Sebaliknya, terdapat korelasi positif antara produksi radikal bebas dengan spermatozoa yang memiliki morfologi kepala yang *amorf*, kerusakan akrosom, kerusakan *midpiece*, *cytoplasmic droplet* dan kerusakan pada ekor. Nazlie (2004) melakukan pengamatan pada spermatozoa kucing dan menemukan bahwa abnormalitas spermatozoa dari sebelum preservasi (0H) sampai hari ke-6. Preservasi cenderung mengalami kenaikan dan peningkatan yang berbeda-beda pada setiap perlakuan. Pada kaput; korpus; kauda epididimis; dan duktus deferens masing-masing terjadi kenaikan rata-rata abnormalitas spermatozoa per hari adalah 1,5; 1,8; 1,8; dan 2,6%.

Selain proses biokimia, kerusakan *deoxynucleic acid* (DNA) dapat juga diakibatkan karena faktor fisiologis dan tekanan lingkungan yang terjadi akibat proses penyimpanan yang terlalu lama. Untuk mengatasi hal tersebut, maka perlu diteliti teknik penyimpanan yang lebih tahan lama dan dapat meminimalkan terjadinya proses fisiologis dan biokimia yang dapat merugikan sel atau jaringan.

**Fertilisasi Mikro**

Tingkat fertilisasi yang mencapai 2 PN dengan teknik ICSI untuk waktu preservasi 1H; 3H; dan 6H masing-masing adalah 8,0; 10,0; dan 5,9% seperti yang disajikan pada Tabel 2. Tingkat fertilisasi hasil dengan teknik fertilisasi *in vitro* (FIV) adalah sebesar 31,3%. Rendahnya tingkat fertilisasi dengan teknik ICSI ini menurut Mansour *et al.* (1996) kemungkinan karena membran oolemma tidak menembus sampai ke dalam semua oosit saat diinjeksi, kemungkinan spermatozoa terdeposit di luar sitoplasma. Hal ini dapat dibuktikan ketika diwarnai hampir sebahagian besar oosit yang diinjeksi, spermatozoa hanya mencapai bagian luar sitoplasma.

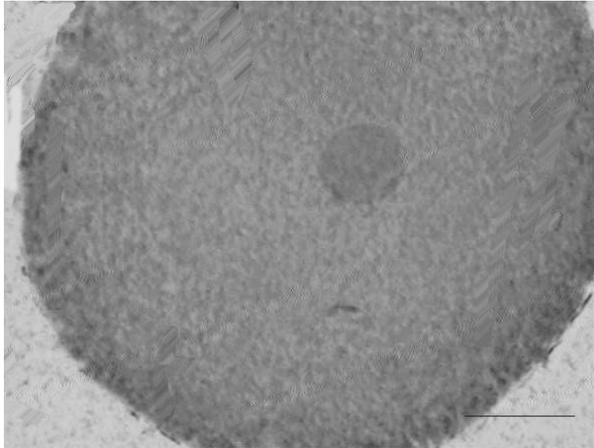
Rendahnya tingkat fertilisasi pada penelitian ini dapat disebabkan oleh ketidakmampuan spermatozoa untuk berkondensasi seperti yang disajikan pada Gambar 1. Ketidakmampuan spermatozoa yang diinjeksi berkondensasi belum dapat diketahui secara pasti. Menurut Hewitson *et al.* (2000) kegagalan fertilisasi dengan teknik ICSI dapat disebabkan karena

**Tabel 2.** Perkembangan spermatozoa dan pronukleus setelah ICSI dengan menggunakan spermatozoa preservasi

Perlakuan	Jumlah oosit	Jumlah perkembangan sperma (%)		Jumlah perkembangan inti oosit (%)		
		Intak	Kondensasi	1PN	2PN	> 2PN
FIV	32	10 (31,3) <sup>b</sup>	5 (15,6) <sup>a</sup>	4 (12,5) <sup>a</sup>	10 (31,3) <sup>a</sup>	3 (9,3) <sup>a</sup>
ICSI 1H	25	18 (72,0) <sup>a</sup>	3 (12,0) <sup>a</sup>	5 (20,0) <sup>a</sup>	2 (8,0) <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
ICSI 3H	10	4 (40,0) <sup>ab</sup>	1 (10,0) <sup>a</sup>	3 (30,0) <sup>a</sup>	1 (10,0) <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>
ICSI 6H	17	6 (35,3) <sup>ab</sup>	2 (11,8) <sup>a</sup>	4 (23,5) <sup>a</sup>	1 (5,9) <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>

<sup>a, ab, b</sup> Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan yang nyata (P<0,05)

ketidakmampuan oosit meneruskan proses setelah meiosis yang ditunjukkan dengan berhentinya metafase-II dan kondensasi kromosom prematur, kelemahan atau kecacatan sentrosom yang dikarakterisasikan dengan berhentinya pembelahan mikrotubul, pemisahan prematur akrosom spermatozoa dan aster dari pronukleus jantan serta aster mikrotubul spermatozoa mengalami pertumbuhan yang cacat.



**Gambar 1.** Kegagalan fertilisasi pada proses ICSI, spermatozoa tidak melanjutkan proses perkembangan menjadi pronukleus jantan. Pronukleus betina (panah); spermatozoa (kepala panah). Bar = 20  $\mu\text{m}$ .

Hewitson *et al.* (2000) mengatakan bahwa pada oosit kera *rhesus* terdapat kesamaan proses antara ICSI dan FIV, yaitu pola pertumbuhan dinamis sitoskeleton menunjukkan bahwa spermatozoa yang diinjeksi bertindak sama seperti spermatozoa yang mengalami ikatan (*binding*) dengan oolema dan mengalami fusi (pembuahan konvensional). Namun analisis dengan *transmission electron microscopy* (TEM) memperlihatkan oosit kera *rhesus* dengan teknik ICSI, memiliki pola kondensasi spermatozoa yang berubah setelah perlakuan injeksi. Keutuhan tudung akrosom pada spermatozoa injeksi dapat mencegah masuknya protein inti maternal selama spermatozoa mengalami kondensasi. Sebagai contoh, *nuclear mitotic apparatus* (NuMA), merupakan protein inti yang penting selama interfase dan dalam pembentukan *spindle*. *Nuclear mitotic apparatus* tidak ditemukan pada spermatozoa, tetapi NuMA maternal masuk ke inti spermatozoa seperti peristiwa kondensasi yang terjadi selama fertilisasi. Setelah perlakuan dengan teknik ICSI, mungkin karena kendala secara fisik spermatozoa yang memiliki akrosom utuh dipaksa masuk ke sitoplasma sehingga NuMA mencegah timbulnya kromatin paternal yang akan berkondensasi. Pindahkan akrosom tidak menghalangi terjadinya kondensasi kromatin *asynchronous*. Hal ini menunjukkan keterlibatan dari struktur lain. Pentingnya kondensasi *asynchronous* ini belum dipahami secara jelas tetapi kemungkinan dapat menyebabkan penurunan kemampuan oosit untuk mengekspresikan gen paternal yang penting atau menghasilkan gen sehingga menyebabkan pembentukan embrio yang abnormal.

Menurut Hewitson *et al.* (2000) bahwa perbedaan oosit dengan teknik ICSI dan FIV, sebagai contoh *vesicle-associated membrane protein* (VAMP), yaitu unsur pokok dari tipikal akrosom spermatozoa yang hilang pada permukaan sel selama spermatozoa melakukan penetrasi. Ini dideteksi sebagai suatu lingkaran kontriksi pada pembentukan pronukleus paternal pada zigot hasil ICSI. Penahanan VAMP setelah ICSI membantu pemisahan kondensasi dan dekondensasi kromatin, berlangsung selama proses pembentukan pronukleus paternal (jantan). *Theca perinuclear* merupakan suatu struktur yang ditemukan pada membran inner akrosom dari spermatozoa dan secara tipikal dipindahkan selama fertilisasi baik pada zona pelusida atau membran plasma oosit, ditemukan berkaitan dengan pronukleus paternal selama 16 jam setelah ICSI. Sintesis DNA seperti yang dideteksi dengan *bromodioxuryridine*, migrasi pronukleus dapat dihambat beberapa jam setelah ICSI pada kedua pronuklei ketika pronukleus jantan tetap mengalami kondensasi pada bagian apikal. Sebaliknya setelah FIV, migrasi pronukleus sudah disempurnakan pada 12 jam setelah inseminasi dan sintesis DNA dideteksi pada kedua pronukleus.

Oosit yang mengalami pematangan yang sempurna dengan indikator adanya badan kutub (Bk-I) memiliki kemampuan untuk mencapai tingkat perkembangan yang lebih tinggi (33,3%) dibandingkan dengan oosit yang diinjeksi tanpa badan kutub (11,1%). Hal ini dimungkinkan karena menurut Hewitson *et al.* (2000) untuk terjadinya fertilisasi memerlukan akurasi peristiwa-peristiwa dalam sitoplasma yang ditandai dengan adanya sentrosom, pusat mikrotubul sel yang mengorganisir terjadinya peristiwa selanjutnya. Sentrosom adalah suatu organel kompleks yang disusun oleh berbagai protein yang berbeda seperti  $\gamma$ -tubulin. Setelah spermatozoa melakukan penetrasi pada oosit maka  $\gamma$ -tubulin maternal menarik sentrosom spermatozoa untuk membantu formasi dan pemanjangan aster spermatozoa. Selanjutnya melakukan proses penggabungan pronukleus jantan dan betina agar terlaksana fertilisasi yang sempurna.

Rendahnya keberhasilan produksi embrio kucing pada penelitian ini kemungkinan karena setelah oosit diinjeksikan dengan satu spermatozoa, oosit tidak dikultur dalam media aktivasi seperti kalsium atau etanol. Oosit dikultur kembali dalam media CR1aa yang ditambahkan 10% serum. Mansour *et al.* (1996) mengatakan medium kultur yang mengandung kalsium setelah oosit diinjeksi, dapat memberi inisiasi aktivasi oosit dengan memicu pelepasan kalsium, suatu mekanisme yang berperan pada beberapa spesies. Hoshi *et al.* (1995) menyatakan bahwa *calcium ionophore* dapat meningkatkan  $\text{Ca}^{2+}$  dalam ooplasma dan memiliki efek yang positif terhadap aktivasi oosit. Menurut Keefer *et al.* (1989) yang disitasi Palermo *et al.* (1996) keberhasilan ICSI pada oosit sapi tergantung pada jenis aktivasi yang dilakukan. Stimulus mekanik dengan pipet injeksi keberhasilannya masih sangat kecil. Lebih dari 95% kasus stimulus ini tidak cukup. Aktivasi dapat diinduksi dengan berbagai macam rangsangan,

termasuk pemaparan *calcium ionophores*, etanol, tegangan listrik, *cycloheximide* dan *6-dimethylaminopurine* (DMAP, penghambat histone kinase). Bogliolo *et al.* (2001) mengatakan perkembangan embrio setelah ICSI pada media *synthetic oviductal fluid* (SOF) yang diaktivasi dengan etanol lebih tinggi dibandingkan media yang tidak diaktivasi yaitu 82,2 dengan 41,2%. Namun ICSI pada oosit kucing belum dapat dipastikan perlunya aktivasi dengan penambahan kalsium atau etanol pada medium kultur. Menurut Tesarik *et al.* (1995) yang disitasi Mansour *et al.* (1996), ICSI pada oosit manusia tidak perlu penambahan kalsium pada medium kultur karena dapat mengakibatkan *overload*. Aktivasi oosit terjadi karena adanya hasil dari pelepasan *sperm-activating factor*. Aktivasi ini akan berperan pada spesies-spesies tertentu.

Menurut Miller dan Smith (2001) tidak sinkronnya antara waktu aktivasi oosit dengan injeksi spermatozoa dapat menimbulkan pembelahan yang abnormal dan perkembangan embrio terhenti. Kegagalan teknik ICSI dapat juga disebabkan karena prosedur injeksi itu sendiri dapat merusak polaritas sitoplasma yang dapat menghambat atau merusak pembelahan selanjutnya dan menghambat pembentukan blastosis. Rendahnya tingkat keberhasilan pada penelitian ini dapat juga disebabkan karena menggunakan spermatozoa yang berasal dari epididimis. Menurut Palermo *et al.* (1996) rendahnya tingkat fertilisasi dan kebuntingan pada teknik ICSI dengan menggunakan spermatozoa epididimis atau testis mungkin terkait dengan perbedaan fisiologi pada karakteristik membran spermatozoa seperti keperluan kolesterol, glikolipid dan membran lipid. Spermatozoa yang berasal dari testis atau epididimis tanpa melintasi masuk ke dalam saluran reproduksi jantan biasanya sebagian besar masih bersifat *immature* (belum matang), terlihat dari keberadaan *cytoplasmic droplets* (Silber *et al.*, 1990).

Spermatozoa manusia mengalami perbedaan modifikasi membran selama transit pada epididimis, termasuk absorpsi sekresi protein spesifik oleh *epitel* dari daerah-daerah yang berbeda pada epididimis, pembentukan ikatan *disulfida*, perubahan pada permukaan jaringan membran, perubahan *phospholipid seluler* dan kandungan asam lemak *phospholipid-likl*. Perubahan ini berkaitan dengan menurunnya kemampuan spermatozoa epididimis melekat dan melakukan penetrasi oosit. Rendahnya persentase fertilisasi dengan ICSI menggunakan spermatozoa *immature* mungkin berhubungan dengan perbedaan struktur membran (Palermo *et al.*, 1996). Namun pada perlakuan fertilisasi mikro pada penelitian ini, spermatozoa yang berasal dari epididimis dipaparkan dalam media CR1aa yang telah ditambahkan dengan *caffeine* dan heparin. *Caffeine* dan heparin dapat digunakan sebagai media kapasitasasi bagi spermatozoa sedangkan preparasi spermatozoa untuk ICSI hanya menggunakan media CR1aa karena kuatir spermatozoa akan *sticky* yang menyebabkan kesulitan saat menangani spermatozoa tersebut.

Rendahnya tingkat keberhasilan pada penelitian ini dapat disebabkan oleh beberapa hal seperti: (1) kesalahan dalam teknik injeksi spermatozoa, (2) tebalnya lapisan zona pelusida pada oosit kucing, (3) kesulitan mengontrol spermatozoa yang dapat menyebabkan banyaknya media yang masuk ke dalam sitoplasma, dan (4) lamanya oosit terpapar di luar inkubator saat penanganan pada mikroskop manipulator. Menurut Morris *et al.* (2002), rendahnya tingkat fertilisasi dan tingginya kegagalan perkembangan embrio dini setelah ICSI dapat juga disebabkan adanya kerusakan pada DNA spermatozoa. Kerusakan DNA ini diuji dengan menggunakan *single cell gel electrophoresis* (Comet assay). Spermatozoa tersebut mampu untuk membentuk PN yang normal namun gagal berkembang setelah ICSI. Kerusakan DNA spermatozoa yang diuji dengan Tunel assay juga dapat mempengaruhi menurunnya efisiensi fertilisasi dan rendahnya embrio yang berkembang setelah FIV. Lundin *et al.* (1996) menyatakan sulit menentukan kegagalan fertilisasi berhubungan dengan faktor spermatozoa, faktor oosit, atau keduanya. Bongso *et al.* (1992) menyatakan bahwa kegagalan fertilisasi dapat disebabkan oleh problem intrinsik oosit.

Permeabilitas membran plasma secara fisiologi mempunyai peranan dalam memfasilitasi dekondensasi dan pembentukan PN setelah ICSI. Pelepasan akrosom dan ekor secara buatan dengan sonifikasi, immobilisasi (Fishel *et al.*, 1995), dan merusak membran plasma dengan pembekuan dan *thawing* sebelum injeksi (Van den Bergh *et al.*, 1995). *Crushing* spermatozoa dengan mikropipet dapat meningkatkan fertilisasi (Fraser dan Strzezek, 2004).

## KESIMPULAN

Kualitas spermatozoa yang dikoleksi dari duktus deferens dan epididimis kucing menurun seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan pada suhu 4° C. Preservasi duktus deferens dan epididimis dalam larutan PBS pada suhu 4° C sampai hari ke-6 masih mampu mempertahankan kualitas spermatozoa kucing, dan masih memenuhi syarat digunakan dalam fertilisasi mikro untuk produksi embrio *in vitro*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aitken, R.J., J.S. Clarkson, and S. Fishel. 1998. The role of free oxygen radicals and sperm function. **Andrology** 24:95-97.
- Azis, N., R.A. Saleh, R.K. Sharman, and I. Lewis-Jones. 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and sperm deformity index. **Fertil. Steril.** 62:387-393.
- Boediono, A. 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improves early development of microfertilized goat. **Reprotech** 1(1):29-34.
- Bogliolo, L., G. Leoni, S. Ledda, S. Naitana, M. Zedda, M. Carluccio, and S. Pau. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured oocyte of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology** 56:955-967.
- Bongso, A., C.Y. Fong, S.C. Ng, and S. Ratnam. 1992. Fertilization, cleavage, and cytogenetics of 48-hours zona-intact and zona-free human unfertilized oocytes reseeded with donor sperm. **Fertil. Steril.** 57:192-330.

- Carolan, C., P. Monaghan, M. Gallagher, and I. Gordon. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Theriogenology** 41:1061-1068.
- Djuwita, I. 2001. Kajian Morfologis dan Fungsi Biologis Oosit Domba setelah Kriopreservasi dengan Metode Vitrifikasi. **Disertasi**. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Duru, N.K., M. Moerhedi, and S. Oehninger. 2000. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membran integrity of human spermatozoa. **Fertil. Steril.** 74:1200-1207.
- Farstad, W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Anim. Reprod. Sci.** 60(61):375-387.
- Fishel, S., F. Lisi, and L. Rinaldi. 1995. Systemic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. **Hum. Reprod.** 10:497-500.
- Fraser, L. and S. Strzezek. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5° C and 16° C. **Folia Histochemica et Cytobiologica** 42(1):49-55.
- Hewitson, I., C. Simerly, T. Dominko, and G. Schatten. 2000. Cellular and molecular events after *in vitro fertilization* and intracytoplasmic sperm injection. **Theriogenology** 53:95-104.
- Hoshi, K., K. Yanagida, Y. Hiroyuki, H. Katayose, and A. Sato. 1995. Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. **Fertil. Steril.** 63:1241-1245.
- Lundin, K., A. Sjogren, and L. Hamberger. 1996. Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. **Fertil. Steril.** 66(1):118-121.
- Mansour, R.T., M.A. Aboulghar, G.I. Serour, N.A. Tawab, Y. Amin, and M.A. Sattar. 1996. Successful intracytoplasmic sperm injection without performing cytoplasmic aspiration. **Fertil. Steril.** 66(2):256-259.
- Miller, J.E. and T.T. Smith. 2001. The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development *in vitro*. **Hum. Reprod.** 16(5):918-924.
- Morris, L.D., S. Hott, and D.R. Brison. 2002. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryos development. **Hum. Reprod.** 17(4):990-998.
- Nazlie, C.S. 2004. Kajian Kualitas Spermatozoa Kucing Asal Eididymis dan Duktus Deferens setelah Proses Preservasi pada Suhu 4° C. **Tesis**. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Palerno, G., P. Schlegel, L. Colombero, N. Zaninovic, F. Moy, and Z. Rosenwaks. 1996. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. **Hum. Reprod.** 11(5):1023-1029.
- Penfold, L.M., L. Jost, D.P. Evenson, and D.E. Wildt. 2003. Normo-versuv teratospermic domestic cat sperm chromatin integrity evaluated by flow cytometry and intracytoplasmic sperm injection. **Biol. Reprod.** 10(3):1730-1735.
- Pope, C.E. 2000. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. **Theriogenology** 53:163-174.
- Rosenkrans, C.F. and N.L. First. 1994. Effect of free amino acids and vitamin on cleavage and development rate of bovine zygotes *in vitro*. **Anim. Sci.** 72:434-437.
- Silber, S.J., P. Devroey, and Z. Nagy. 1994. ICSI with testicular and epididymal sperm. **ESHRE Workshop, Brussels**. Belgium.
- Soeradi, O. 2004. **Radikal Bebas pada Pria Infertil**. Kumpulan Makalah/Abstrak Paradigma Terkini Genetika dan Reproduksi. Departemen Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Steel, R.G.D. dan J.H. Torrie. 1991. **Prinsip dan Dasar Statistik**. Edisi kedua. Gramedia, Jakarta.
- Van den Bergh, A., E. Bertrand, J. Biramane, and Y. Englert. 1995. Importance of breaking a spermatozoon's tail before intracytoplasmic injection: a prospective randomized trial. **Hum. Reprod.** 10:2819-2820.