

Teknik suntikan sperma intrasitoplasmik – satu kaedah bioteknologi pembiakan terkini lembu

(Intracytoplasmic sperm injection technique – an advanced reproductive biotechnology in cattle)

Habsah Bidin dan Musaddin Kamaruddin

Pengenalan

Kaedah suntikan sperma intrasitoplasmik (ICSI) adalah satu teknik mikromanipulasi embrio terkini dalam bidang bioteknologi reproduktif. Prosedur ICSI melibatkan pengutipan sperma dan menyuntiknya ke dalam oosit matang dengan menggunakan peralatan mikromanipulator. Pada manusia, ICSI sering digunakan bagi mengatasi masalah kemandulan atau ketidaksuburan lelaki. Aplikasi teknik ICSI juga boleh menyelesaikan masalah baka pejantan yang berkualiti tinggi, tetapi mempunyai bilangan sperma yang rendah.

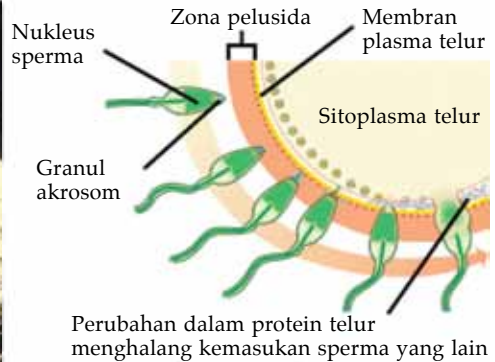
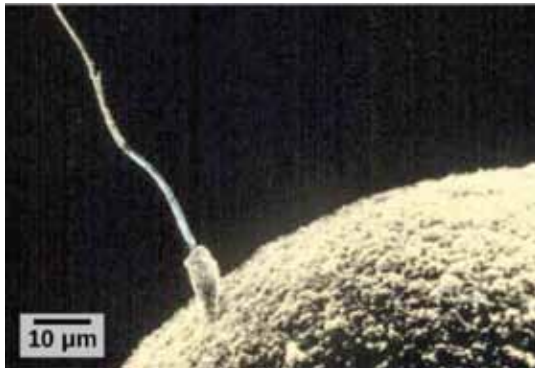
Apa itu ICSI?

Suntikan sperma secara intrasitoplasmik (ICSI) juga dikenali sebagai suntikan mikroinseminasi ke dalam sitoplasma (MIMIC). Prosedur mikromanipulasi ini adalah satu teknik baharu yang dijalankan di dalam makmal. Teknik ICSI melibatkan suntikan satu sperma terus ke dalam sitoplasma oosit matang dengan menggunakan dua unit mikropipet iaitu jarum suntikan dan pipet pemegang (*holding pipette*). Kaedah ini tidak melibatkan bilangan sperma yang banyak seperti proses inseminasi antara sperma dengan oosit yang berlaku dalam proses persenyawaan *in vitro* (IVF).

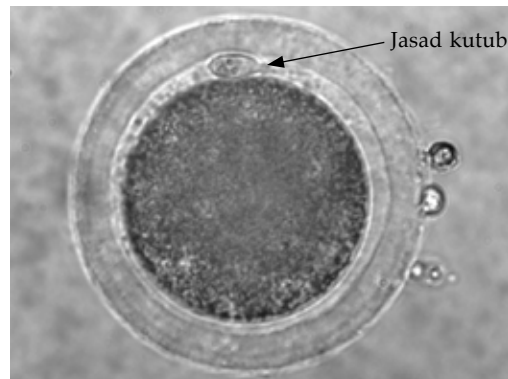
Kesemua proses biologi yang biasa terdapat dalam kaedah persenyawaan secara semula jadi ataupun secara *in vitro* tidak terlibat dalam proses ICSI. Proses ini termasuklah inseminasi sperma dalam oosit (telur yang belum disenyawakan), pengikatan sperma kepada zona pelusida, proses penembusan zona pelusida oleh sperma dan penyatuan sperma dengan oolema (*Gambar rajah 1*). Dalam kaedah ini, sama ada keseluruhan sperma, sperma tanpa ekor, sperma yang mati, sperma yang tidak boleh bergerak atau sperma yang abnormal boleh disuntik ke dalam oosit. Proses kapasitasi dan tindakan akrosom sperma juga tidak diperlukan dalam ICSI.

Lazimnya, ICSI digunakan bagi mengatasi masalah kecacatan biologi seperti yang berikut:

1. Bilangan sperma yang kurang
2. Motiliti atau pergerakan sperma yang rendah
3. Sperma yang tidak berkeupayaan untuk menembusi oosit
4. Sperma yang abnormal yang boleh menghalang persenyawaan normal daripada berlaku



Gambar rajah 1. Proses persenyawaan antara sperma dengan oosit (sumber: <http://content.learntoday.info/Thuze/Biology/content/ch43.html>)



Gambar 1. Oosit yang dikelilingi oleh sel kumulus Gambar 2. Oosit matang bersama jasad kutub

Kaedah ICSI

Penghasilan embrio melalui teknik ICSI bergantung kepada pembangunan kaedah ICSI itu sendiri selain kaedah asas dalam penghasilan embrio secara *in vitro*. Kaedah asas ini termasuklah penyediaan oosit dan sperma untuk pelaksanaan proses pra dan pascaICSI dan pengkulturan embrio secara *in vitro* selama 7 hari di dalam inkubator berkarbon dioksida (CO₂) yang dibekalkan dengan 5% gas CO₂ pada suhu 38.5 °C dengan lembapan 95%.

Penyediaan oosit dan sperma untuk ICSI

Kualiti oosit merupakan penentu kepada keupayaan oosit tersebut mencapai kematangan dan seterusnya berkebolehan untuk berkembang selepas persenyawaan berlaku. Dalam teknik ICSI, hanya oosit yang berkualiti tinggi dari segi morfologi iaitu yang mempunyai ooplasma yang sekata dan dikelilingi oleh beberapa lapisan sel kumulus digunakan (Gambar 1). Proses pematangan oosit adalah penting bagi menghasilkan oosit yang sempurna kematangannya dan mempunyai jasad kutub yang memudahkan ICSI dilaksanakan pada kedudukan oosit yang betul. Oosit matang mempunyai morfologi sitoplasma yang sekata dan jasad kutubnya terletak di dalam ruang di antara sitoplasma dengan lapisan zona pelusida (Gambar 2).

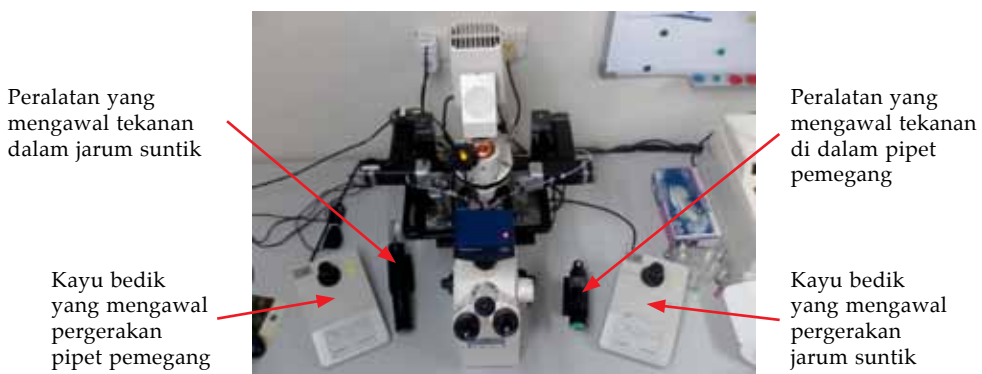
Proses pematangan oosit dilakukan di dalam medium kultur tisu (TCM 199) yang ditambah dengan 25% serum, 1 µg/ml hormon oestradiol-17β dan antibiotik gentamisin. Pematangan oosit dilakukan selama 20 – 24 jam di dalam inkubator berkarbon dioksida yang mengandungi 5% gas CO₂ pada suhu 38.5 °C dengan lembapan 95%. Selepas proses pematangan, oosit diaktifkan dengan menggunakan inofor kalsium A23187 sama ada di peringkat pra atau pascaICSI atau di kedua-dua peringkat. Oosit yang mempunyai jasad kutub sahaja akan dipilih untuk prosedur ICSI.

Air mani sejuk beku lembu baka Brakmas telah digunakan dalam kajian ini. Ia dibasuh untuk membuang cecair seminal sebelum diletakkan di dalam medium Brackett-Oliphant (BO) yang mengandungi 20 mg/ml heparin sebelum digunakan untuk ICSI. Untuk proses suntikan, 10 – 12 titisan mikro yang mengandungi 2 µl medium pemegangan (*holding medium*) berserta satu titisan nipis 4 µl PVP disediakan dan dilitupi dengan minyak mineral di dalam piring petri 35 mm. Dalam kaedah ICSI, hanya satu sperma diperlukan untuk mensenyawakan oosit dan kaedah ini menjadi pilihan untuk sperma berkualiti rendah kerana sperma yang motil tidak diperlukan.

Langkah-langkah dalam teknik ICSI

Kaedah ICSI melibatkan penggunaan mikroskop terbalik (*inverted microscope*) yang dilengkapi dengan peralatan mikromanipulator berteknologi tinggi (*Gambar 3*). Dua peralatan asas yang digunakan ialah pipet pemegang dan jarum suntikan (*injection needle*). Jarum suntikan digunakan untuk mengutip sperma dan melakukan suntikan mikro (*microinjection*) yang mempunyai hujung yang tajam dan serong bagi menembusi lapisan zona pelusida oosit untuk menendepositkan sperma ke dalam sitoplasma oosit.

Diameter dalaman (ID) jarum suntikan adalah antara 8 – 9 mikron dan diameter luar (OD) kira-kira 10 – 11 mikron. Pipet pemegang pula mempunyai OD berukuran antara 80 – 120 mikron dan ID antara 10 – 20 mikron yang lebih besar daripada jarum suntikan dan mempunyai hujung yang bulat dan tumpul. Pipet ini



Gambar 3. Inverted microscope yang dilengkapi dengan peralatan mikromanipulator di kedua-dua belah

digunakan untuk memegang oosit dengan tekanan negatif semasa prosedur suntikan mikro.

Kedua-dua pipet pemegang dan jarum suntikan dibengkokkan dengan sudut 30° untuk membenarkan kedua-duanya diletakkan secara selari di atas piring suntikan. Ia digerakkan dengan menggunakan kayu bedik (*joystick*) manakala proses suntikan yang dilakukan dilihat melalui kanta mata mikroskop. Sebanyak 10 – 12 titisan 2 µl medium pemegang untuk setiap oosit disediakan mengelilingi titisan 4 µl 10% polyvinylpyrrolidone (PVP) yang dicampurkan dengan 1 µl suspensi sperma.

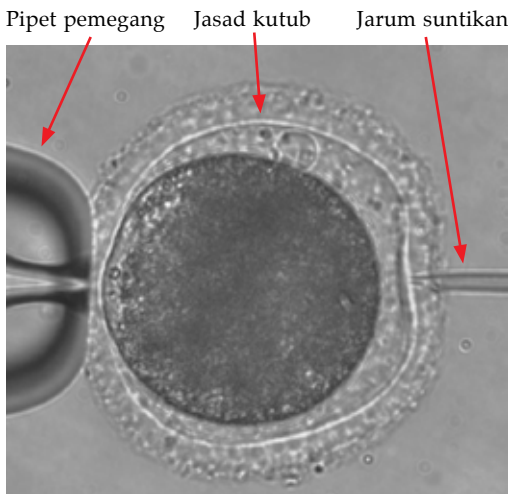
Pipet pemegang di sebelah kiri akan memegang oosit dan jasad kutub akan diletakkan pada kedudukan pukul 6.00 atau 12.00, manakala satu sperma dikutip dan disedut masuk ke dalam jarum suntikan di sebelah kanan (*Gambar 4*).

Jarum suntikan yang mengandungi sperma ditolak menembusi zona pelusida oosit sehingga ke dalam ooplasma dan sperma dilepaskan ke dalam ooplasma oosit tersebut dengan kandungan medium yang minimum (*Gambar 5*). Selepas suntikan, oosit menjalani proses pengkulturan seperti dalam prosedur biasa IVF.

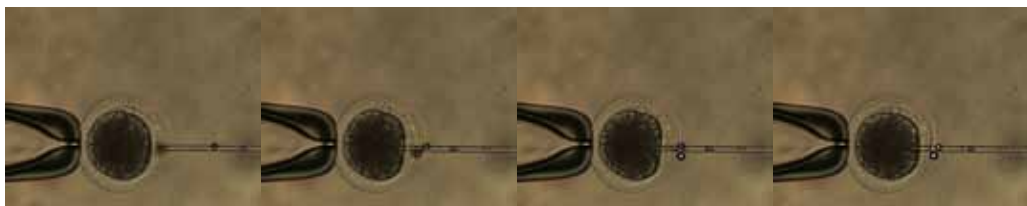
Pengkulturan embrio secara in vitro (IVC)

Sistem pengkulturan yang sesuai dan optimum digunakan bagi memastikan kelangsungan embrio untuk terus hidup dan berkembang sehingga ke peringkat blastosista. Medium pengkulturan embrio yang mempunyai kandungan nutrien dan tenaga yang tinggi adalah penting untuk memenuhi keperluan embrio bagi menjamin pertumbuhan yang optimum.

Dalam kajian ini, selepas proses suntikan sperma ke dalam oosit dilakukan, zigot (telur yang telah disenyawakan) akan dipindahkan ke dalam medium pemegang selama 15 minit sebelum dieram di dalam medium IVC iaitu medium CR1 yang mengandungi asid amino (CR1aa). Embrio akan dieram selama 7 hari di dalam inkubator yang mengandungi 5% gas CO₂ pada suhu 38.5 °C



Gambar 4. Kaedah ICSI



Gambar 5. Prosedur ICSI

dengan lembapan 95% untuk membolehkan zigot berkembang ke peringkat blastosista. Lazimnya, embrio di peringkat blastosista yang terhasil akan disejuk beku dalam cecair nitrogen (LN₂) terlebih dahulu sebelum dipindahkan ke dalam induk penerima atau ibu tumpang pada masa yang lain.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kejayaan ICSI

Kadar kejayaan persenyawaan, kadar blastosista dan kadar kelahiran lembu masing-masing telah dilaporkan antara 50 – 80%, 4 – 40.1% dan 9 – 50%. Kadar persenyawaan dan kedayahidupan oosit daripada proses ICSI adalah lebih rendah jika dibandingkan dengan proses persenyawaan secara *in vitro*. Keadaan ini disebabkan oleh keperluan rawatan tambahan seperti rawatan pengaktifan oosit yang perlu dijalankan sebelum (pra) atau selepas (pasca) ICSI. Proses pengaktifan oosit boleh diaruh di dalam makmal dengan menggunakan pelbagai stimuli termasuk pendedahan kepada bahan-bahan seperti kalsium inofor, ionomycin, etanol, cycloheximide, 6-dimethylaminopurine dan rawatan khas seperti arus elektrik.

Dalam kajian oleh MARDI yang dijalankan di Makmal Pembiakbakaan Haiwan dan Fisiologi (Gamet), Serdang, pengaktifan oosit dengan menggunakan inofor kalsium A23187 sama ada pra atau pascaICSI didapati lebih berkesan jika dibandingkan dengan gabungan rawatan pengaktifan pra dan pascaICSI. Inofor kalsium merupakan bahan kimia yang sering digunakan untuk pengaktifan oosit selain menyumbang kepada keseimbangan dalam proses pematangan oosit. Purata peratus pembelahan dan blastosista untuk pengaktifan oosit pra dan pascaICSI yang diperolehi masing-masing ialah 65.16% dan 6.00% serta 59.99% dan 4.84%.

Penggunaan teknik ICSI dalam industri ternakan di Malaysia

Kaedah bioteknologi reproduktif seperti kaedah pernian beradas (AI), penghasilan embrio secara *in vitro* (IVEP), ovulasi berganda dan pemindahan embrio (MOET) dan kaedah mikromanipulasi embrio mempunyai potensi yang tinggi untuk menyumbang kepada kejayaan program pembiakbakaan haiwan untuk meningkatkan bilangan ternakan yang berkualiti di Malaysia. ICSI merupakan satu kaedah manipulasimikro embrio dalam bidang bioteknologi reproduktif yang berpotensi untuk menyumbang kepada penghasilan haiwan ternakan selain menambah pengetahuan asas mengenai mekanisme biologi persenyawaan. Kaedah ini berguna untuk menyelamatkan atau mengguna pakai sepenuhnya gamet jantan yang abnormal daripada pejantan yang tinggi genetiknya.

Kesimpulan

Dalam teknik ICSI, hanya satu sperma diperlukan untuk mensenyawakan oosit. Aplikasi teknik ICSI boleh menyelesaikan masalah baka pejantan yang mempunyai kecacatan biologi, tetapi mempunyai nilai genetik yang tinggi. Dalam kajian yang dijalankan terhadap ternakan lembu, rawatan pengaktifan oosit dengan menggunakan inofor kalsium A23187 sama ada pra atau pascaICSI mempengaruhi penghasilan blastosista. Purata peratus pembelahan melebihi 60% dan blastosista melebihi 5% telah dihasilkan daripada pengaktifan oosit pra dan pascaICSI. Kajian lanjut perlu dijalankan bagi membangunkan prosedur ICSI yang lebih cekap dan ringkas bagi meningkatkan penghasilan kadar persenyawaan dan bilangan blastosista embrio lembu yang lebih tinggi.

Bibliografi

- Garcia-Rosello E., Garcia-Mengual, E., Coy, P., Alfonso, J. dan Silvestre, M.A. (2008). Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: An update. *Reprod. Dom. Anim.*: 1 – 9
- Habsah, B., Izuan Bahtiar, A.J., Mohd Padzil, A.R., Ahmad, J., Ajis, H., Mohamad Naim, Z. dan Musaddin, K. (2013). Conception rate of ICSI-derived bovine embryos. *Proceeding of 10th Malaysian Genetic Congress 2013*
- Habsah, B., Nurul Atikah, O., Nor Azlina, A.A. dan Musaddin, K. (2012). Effects of calcium ionophore A23187 on oocyte activation in the production of bovine embryos using ICSI procedure. *Proceeding of 33th Malaysian Society of Animal Production Annual Conference*, m.s. 148 – 149
- Korkmaz, O., Kuplulu, S., Agca, Y. dan Polat, I.M. (2013). Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 37: 26 – 30

Ringkasan

ICSI merupakan salah satu kaedah penghasilan embrio secara *in vitro* dalam bioteknologi reproduktif haiwan yang melibatkan satu sperma yang disuntik ke dalam oosit matang dengan menggunakan peralatan mikromanipulator. Lazimnya, ICSI digunakan apabila pejantan mempunyai nilai genetik yang tinggi, tetapi mempunyai bilangan sperma dan motiliti yang rendah serta kurang keupayaan mensenyawakan oosit secara normal. Terdapat banyak faktor yang mempengaruhi kejayaan kaedah ICSI, antaranya adalah teknik ICSI, morfologi sperma dan oosit, jenis medium, masa dan kecederaan yang mungkin timbul semasa suntikan sperma ke dalam sitoplasma oosit. Kemahiran pakar embriologi dan kekerapan teknik ICSI dijalankan juga mempengaruhi kejayaan ICSI. Teknologi ini boleh diaplikasi untuk menyelamatkan pejantan yang mempunyai kecacatan biologi, tetapi bernilai genetik yang tinggi.

Summary

ICSI is one of the *in vitro* embryo production methods in advanced reproductive biotechnology. It involves a single sperm injection into a matured oocyte using a micromanipulator. ICSI is used when male animals of high genetic value have reduced sperm number and motility, and also less capable of normal fertilization. There are many factors that influence the success rate of ICSI namely, ICSI technique, sperm and oocyte morphology, medium type, period of injection and injury which might arise during injection. The skill of the embryologist and the frequency of carrying out ICSI are also important in contributing to the success of ICSI. This technology can be applied to save high genetic value males with biological defect.

Pengarang

Habsah Bidin

Pusat Penyelidikan Ternakan Strategik, Stesen MARDI Kluang,

Beg Berkunci 525, 86009 Kluang Johor

E-mel: habsahb@mardi.gov.my

Musaddin Kamaruddin

Pusat Penyelidikan Ternakan Strategik, Ibu Pejabat MARDI , Serdang,

Peti Surat 12301, 50774 Kuala Lumpur