

Teknik Mikroinjeksi Oosit:

(Suatu Harapan untuk Penderita Oligoastenoteratozoospermia)

Zulfitri

Abstrak. Membandingkan keberhasilan antara 2 kelompok penderita dalam penggunaan teknik mikroinjeksi oosit. Keberhasilan mikroinjeksi antara sperma yang berkualitas rendah dengan dua kelompok pasien, yaitu kelompok I, pasien dengan oosit segar baru diperoleh (135 orang) dan kelompok II, pasien dengan oosit umur satu hari dan mengalami kegagalan fertilisasi invitro (35 orang). Sperma diinjeksi ke sub-zona atau langsung ke ooplasma. Kelompok I, fertilisasi terjadi 16,6% dari 771 oosit dan polispermi serta partenogenetis 2,3%. Kehamilan terjadi 5 orang dan 1 yang melahirkan. Kelompok II, fertilisasi terjadi 14,9% dari 118 oosit dan polispermi serta partenogenetis 2,8% dan tidak terjadi kehamilan. Mikroinjeksi sperma tunggal dari suami penderita Oligoastenoteratozoospermia berat langsung ke ooplasma diperoleh 4 zigot dari 38 oosit dan memiliki pronukleus ganda, dan ditempatkan kembali kepada pasien, dan tidak terjadi kehamilan. Jadi mikroinjeksi subzona merupakan teknik yang memberi harapan untuk penderita Oligoastenoteratozoospermia yang berat. (*JKS 2007; 3:151-158*)

Kata Kunci: Mikroinjeksi Oosit Harapan Penderita Oligozoospermia

Abstract. By comparing 2 successful groups of patients using the microinjection oocytes techniques.. Between microinjection of low-quality sperm in two groups of patients, the first group, patients with the new oocytes (135 person) and the second group, patients with oocyte age one day and have failed in vitro fertilization (35 person). Sperm injected into the sub- zone or directly to ooplasma. The first group, fertilization occurred 16,6% of 771 oocytes and polysperm also partenogenetis 2,3%. Pregnancy occurred in 5 persons and which one of them gave a birth. The second group, fertilization occurred 14,9 % of 118 oocytes and polysperm also partenogenetis 2,8% and no pregnancy occurred. The single sperm microinjection from the husband of severe Oligoastenoteratozoospermia's patient directly to ooplasma obtained 4 zygote of 38 oosit and had double pronuclei, and replaced to the patient and no pregnancy occurred. Subzone microinjection is a technique that gives expectation to severe oligoastenoteratozoospermia's patient. (*JKS 2007; 3:151-158*)

Keywords: the oosit microinjection healing technic gives a new hope for oligozoospermia sufferers

Pendahuluan

Pasien dengan oligosperma berat biasanya kombinasi dari kerusakan sperma yang komplek dengan peluang yang sangat kecil untuk terjadi *etc* konsepsi secara spontan. Telah dilaporkan bahwa kerusakan sperma dengan kombinasi tiga atau lebih cacat yang ditemukan pada analisis semen.

Zulfitri adalah dosen pada Bagian Biologi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala

Fertilisasi invitro spontan kurang dari 8%. Tubal embrio transfer (TET) ditransfer pada tahap pronuklear. Transfer embrio dalam tunbal merupakan suatu gagasan untuk memperbaiki faktor infertil pada laki-laki. Bagaimana juga TET tidak memberikan harapan yang besar bagi pasien karena oosit dari pasangan masih diperlukan untuk fertilisasi sebelum ditransfer ke tuba fallopii.¹ Pelubangan zona adalah gambaran utama. Prosedur ini diharapkan dapat membantu penetrasi sperma. Studi

klinik dengan oosit manusia belum menghasilkan kehamilan. Lebih dari itu, pelubangan zona dengan larutan tyrodes sudah ditemukan mempengaruhi proses miosis yaitu menghambat anafase II. Malter dan Cohen mengemukakan suatu pendekatan baru dengan membedah sebagai zona pasial menggunakan energi mekanik (patial Zona Dissection). Telah terjadi 8 kehamilan dengan menggunakan teknik ini.¹

Untuk pembedahan zona pa'sial oosit dimanipulasi dengan meletakkan dalam medium inseminasi dengan sperma motil berdensitas 5-20 juta/ml. Jumlah sebanyak itu sulit diperoleh pada laki-laki yang bermasalah berat. Penanganan untuk kasus dengan densitas sperma rendah yang berat diperlukan cadangan sperma secara langsung guna dimasukkan ke oosit (microinsemination or microfertilization), kebalikannya disebut makroinseminasi.² Dilihat dengan pelubangan zona dan pembedahan sebagai zona. Mikro inseminasi dapat menembus ruang peri vitellina atau langsung ke sitoplasma telur (mikroinseminasi mikroinjeksi ke dalam sitoplasma).³

Persiapan Telur

Sebelumnya wanita disuper ovulasi dengan GNRH antagonis, kemudian dirangsang dengan Human menopause gonadotropin (HMG) dan human chorionic gonadotropin (HCG). Oosit dibantu dan dikultur seperti semula.^{4,5}

Oosit manusia yang dipakai dalam mikro injeksi yaitu pada germinal vesicle-bearing. Oosit dikultur pada suhu 37 derajat selsius, 5% CO₂ dalam modifikasi medium Hans F-10 dengan 7,5 serum fetal, cord manusia (HF-10 + 7,5% HFO). Secara invitro sampai

badan kutup terbentuk, yaitu pada tahap perkembangan metafase meiosis II.¹ Sel-sel kumulus dihilangkan dari oosit dengan 0,1% Hyloronidase pada HF-10 dengan 7,5% HFCS dengan cairan Hepes untuk mendapatkan konsentrasi akhir 10 mM.⁵

Mikromanipulasi

Setelah oosit diperoleh sel-sel kumulus dan corona radiata kembali dicuci dalam medium M2 dengan 1 mg/ml Hyaloronidase selama 1 menit. Hanya oosit lengkap yang telah menampakkan badan kutup pertama yang dimikroinjeksi. Sperma inmotil dimasukkan ekor pertama dalam ujung pipet mikro injeksi.^{2,4} Oosit dipegang oleh pipet pemegang dan mikro injeksi dengan mendorong pipet injeksi melintasi zona pelusida dan langsung kedalam sitoplasma. Pipet injeksi diperlakukan dengan hati-hati dan oosit dilepaskan dari pipet pemegang. Manipulasi dilakukan dibawah mikroskop Leitz fase kontras dengan Leitz mikromanipulator.⁶

Dalam kasus ekstrim oligozoospermia, spermatozoa diambil dari konsentrasi suspensi sperma 5 mikro liter dan di transfer ke dalam sentral droop dimana larutan PVP untuk memindahkan sisa yang tidak terpakai dan untuk memudahkan penangana.²

Aktivitas Telur

Pronukleus diperkirakan muncul setelah 16-18 jam setelah oosit diinjeksi, 24 jam kemudian keadaan embrio membelah (cleavage). Jika embrio telah dihasilkan lebih kurang 48 jam setelah injeksi sperma sampai tiga embrio yang paling baik dimasukkan kedalam saluran uterin sedangkan embrio sisanya disimpan sebagai embrio

cadangan.^{1,4} Setelah fertilisasi, telur melakukan meiosis secara lengkap dengan membentuk dua badan kutup dari sperma haploid dan set kromosom telur terorganisir ke dalam pronukleus. Pada waktu yang sama, kromosom dekondensasi dan meripikasi DNA.¹

Perubahan sperma dengan berkondensasi dan hilangnya Arginin sebagai ciri khas sperma yang kaya si stein sebagai hasil fertilisasi. Kemampuan dekondensasi sperma membutuhkan sitoplasma telur. Fertilisasi dengan menyuntikkan sperma ke dalam telur yang belum matang (tahap terbentuk gelembung germinal), tetap berinteraksi tetapi diskondensasi sampai gelembung germinal pecah. Kemudian sperma berkondensasi tetapi tidak membentuk pronukleus. Reaksi penyuntikan sel telur dapat dilihat berdasarkan keteraturan dari sitoplasma, ukuran membran plasma, hubungannya dengan zona pelusida, volume ruang perivitellina.²

Mekanisme Metode Mikroinjeksi Oosit Manusia

Percobaan klinik telah mencoba memusatkan perhatian total pada resiko yang terjadi terhadap pasien yang telah menghasilkan embrio, penelitian oleh National University Hospital dan Singapur science council mengenai injeksi sperma pada subzonal sudah dimulai sejak pertengahan tahun 1988.¹ Seluruh laki-laki memiliki kariotipe kromosom abnormal dikeluarkan sebagai calon yang mungkin untuk transfer subzonal sebelum mereka datang ke program assisted reproductive technique (ART). Mereka diberi perlakuan sebagai suatu kelompok dengan faktor lelaki yang bermasalah, termasuk di dalamnya terapi hormon (mesterotone [profinorum, sheering

AG, Berlin, Germany] dan gonadotropin), Varicolectomies dan inseminasi intra uterin lebih kurang 3 siklus.

Mereka dibagi menjadi 2 kelompok:⁶

1. Pasien dengan densitas sperma yang sangat rendah dan motilitas rendah dengan oosit segar.
2. Pasien dengan oosit umur sehari yang mengalami kegagalan fertilisasi.

Untuk kelompok satu laki-laki dengan variasi yang kecil sampai normal tetapi motilitas rendah (0-59%). Bagaimanapun juga, kualitas sperma (densitas dan motilitas) yang sangat rendah pada saat IVF mereka diberi kesempatan untuk ikut di dalam program subzonal transfer. Subzonal transfer hanya dilakukan sebagai upaya terakhir untuk densitas sperma yang sangat rendah. Pada seluruh kasus sperma motil dari pasien adalah sangat lamban. Untuk memberikan gambaran ke depan hanya kira-kira 10% dari pasien laki-laki yang bermasalah dalam program ART menjalani subzonal transfer. Untuk subzonal transfer konsentrasi akhir diperoleh melalui sentrifugasi mikro (MSE, Lough Borough, UK) pada 6000 rpm selama 10 menit.⁶ Sedikit supemat dipindahkan, mi sudah mengandung konsentrasi yang cukup untuk subzonal transfer. Larutan ficoll (5% dalam fosfat, buffer salin 0,1ml) ditambahkan, suspensi dipelihara pada 4 derajat selsius sampai dilakukan reaksi akrosom.⁶

Akhirnya sperma dengan densitas yang sangat rendah (kecil dari 0,3 juta/ml yang diperoleh setelah mikrosentrifugasi) dilakukan injeksi ooplasma, dilakukan pada 3 kasus. Setelah itu dilanjutkan dengan subzonal injeksi. Untuk 3 kasus pertama pada ooplasma injeksi dimasukkan semen

yang sudah disonikasi (artex sonicdemembrator no. 150, New York). Sebelum pemisahan kepala sperma dari ekor menggunakan gradien perkol 90% : 45% dalam normasalin (MSE mikrosentrifugasi 13000 rpm selama 10 menit). Kepala sperma terlepas dalam ficol 5% sampai diperoleh konsentrasi terakhir 3-5 juta/ml.^{2,4}

Suspensi sperma dimasukkan ke mikropipet sperma (drummond, biomal, PA) dan diletakkan di ujung mikropipet dengan eppendorf mikroinjektor 5242 (Germany). Mikropipet dipersiapkan dengan narisinge micropuler (Japan) dan narisinge microgrinder. Diameter eksternal ujung mikropipet untuk transfer subzonal 10-15 mikron meter dan diameter internal 8-12 mikron meter. Begitu juga untuk injeksi ooplasma diameter ujung pipet 8-10 mikron meter dan 5-7 mikron meter. Pemegang pipet adalah dipasteurisasi dalam etanol.^{2,6}

Pasien wanita (166 orang) rata-rata berumur 33-36 tahun. Mereka dirangsang dengan salah satu diantara reagen berikut:

1. Klonipenesitrate + Hmg (1 pasien)
2. FSH + kombinasi Hmg (129 pasien)
3. Guserilin asetat regulatio + FSH (36 pasien)

Ada 163 oosit dari pasien yang dilakukan subzonal transfer, tetapi hanya 171 pada metafase II. Manipulasi hanya dapat dilakukan pada oosit metafase II. Kelompok lain yang dilakukan subzonal sehari setelah koleksi (karena tidak mampu melakukan fertilisasi). Untuk kelompok ini sperma dibuahi dalam temperatur kamar untuk dilakukan subzonal transfer.⁷

Masing-masing oosit dimanipulasi dengan memasukkan dalam medium T6 (HEPES) dan 10% serum manusia

sesaat sebelum mikromanipulasi. Oosit dengan polar bodi yang terletak pada keadaan pukul 6 dan 12 dimasukkan secara langsung sperma pada keadaan pukul 3 dengan mikropipet. Subzonal transfer 7,7-10 sperma motil dimasukkan ke dalam rongga perivitellina. Segera setelah injeksi ooplasma mikropipet ditarik dengan segera. Setelah prosedur ini oosit dicuci dalam medium T6 sebelum diinkubasi dalam 5% CO₂, 5% O₂ dan 90% N₂ pada 37 derajat selsius. Pronukleus oosit diperiksa setelah 14-18 jam, bila ada fertilisasi di transfer ke tubafallopai, atau rongga uterus.^{4,7}

Keberhasilan Metode Mikroinjeksi Oosit Manusia

Kelompok 1 transfer subzonal yang dilakukan pada 771 oosit metafase II terjadi plasma injeksi 13,3%. Fertilisasi normal yang mono sperma terjadi 16,6% dan 12,7% pada kelompok sperma jelek dengan densitas kecil dari 5 juta/ml.⁶

25,4% dalam kelompok ini membutuhkan transfer subzonal meskipun dengan densitas sperma lebih dari 20 juta/ml. Secara bersamaan IVF memperlihatkan fertilisasi 17% dalam katagori besar dari 5 juta/ml. Transfer subzonal dan IVF tingkat keberhasilan fertilisasinya tidak significant. Juga tidak berbeda pada fertilisasi monosperma antara grup dengan faktor laki-laki yang bermasalah untuk kelompok 2 (13,9% dan 16,9%).⁶

Yang paling menarik bahwa partenogenesis sangat rendah, ini terjadi pada transfer multisperma ke dalam rongga perivitellina Hanya 1,9% untuk oosit dalam kelompok 1 dan 3,7% oosit dalam kelompok 2. Aktivitas partenogenesis pada oosit tua juga rendah (4,3%).⁵

Tingkat kehamilan (PR) sangat rendah, hanya 5 kehamilan untuk seluruh transfer subzonal embrio, setelah 58 peletakan embrio dalam grup 1. Hanya satu pasien yang melahirkan pertama kali (20 April 1989, bayi laki-laki yang sehat dengan berat 3,36 Kg). Inilah kehamilan yang pertama yang dilaporkan.⁵

Pada kehamilan ke dua suami juga menderita oligoastheno teratozoospermia (3ml semen dengan jumlah 1.1 juta/ml dengan motilitas sperma yang sangat melemah). Setelah menyiapkan sperma akhirnya diperoleh 1 juta spermamotil dalam 0,20 ml medium. 10 oosit dikumpulkan, pada 6 oosit berhasil dilakukan subzonal transfer, 4 sisanya dilakukan IVF. Takfeaturpun terjadi fertilisasi pada ke-4 oosit, zigot yang diperoleh melalui subzonal transfer dua diantaranya monosperma, satu disperma. Zigot monosperma ditransfer ke tuba fallopii kiri pada tahap pronuklear. Suatu keberuntungan zigotnya berkembang dan terjadi kehamilan.^{5,6}

Kehamilan ketiga juga terjadi pada pasien dengan oligoastheno teratozoospermia berat, dengan densitas sperma dengan 2,7 juta/ml dengan motilitas rendah. Istrinya menghasilkan 12 oosit dan seluruhnya dilakukan subzonal transfer. Deteksi dengan ultra sound (US) membuktikan adanya fetus, akan tetapi abnormalitas kromosom dengan trisomi 16.¹

Kehamilan ke-4 terjadi secara biokimia dengan meningkatnya beta hCG tetapi kehamilan tidak terlihat dengan menggunakan US. Kehamilan ke-5 terjadi pada ibu usia 42 tahun yang menderita subfertil primer. Suaminya 49 tahun mempunyai sperma 15 juta/ml dengan 12% yang motil dan 28% bentuknya normal. Istrinya menghasilkan oosit seluruhnya

dilakukan SZT. Terbentuk 4 embrio monosperma dan ditempatkan dalam tuba. Sebanyak dua embrio ditransfer (satu dengan mikro inseminasi sperma transfer dan satu melalui IVF. Ibu itu melahirkan bayi laki-laki seberat 3,095 Kg, 29 April 1991.⁶

Injeksi ooplasma juga dikerjakan pada 38 oosit metafase II dan terjadi lisis oosit 12 buah (31,6%). Aktivitas partenogenesis tanpa pada tiga oosit (11,5%). Fertilisasi monosperma terjadi pada 4 oosit (15,4%, mereka ditransfer pada dua orang pasien akan tetapi tidak menghasilkan kehamilan.^{3,8}

Pembahasan Fertilisasi Dan Kehamilan Melalui Subzonal Transfer Dan Injeksi Ooplasma

Pasien dengan gangguan sperma yang berat mengalami kesulitan dalam fertilisasi invitro secara spontan. Peningkatan densitas dan motilitas sperma sangat penting dan berpengaruh langsung terhadap fertilisasi invitro. Metode yang baru menggambarkan konsentrasi sperma rendah dan motilitas yang lambat dapat dibantu dengan SZT. Kemampuan sperma memfertilisasi ovum akan sangat tinggi bila terjadi peningkatan adenosin 5 triphosfat dari sperma.⁴

Mikro inseminasi masih memiliki kelemahan yaitu rendahnya kemampuan fertilitas (16,3%) untuk SZT sedangkan ooplasma injeksi 15,4% dan aktivitas partenogenesis yang sangat tinggi untuk injeksi ooplasma (11,5%). Kejadian polispermi dan partenogenesis untuk sub zonal transfer adalah rendah (2,3 dan 2,8%).¹

Dalam studi ini keberhasilan fertilisasi adalah rendah untuk kelompok sperma yang jelek 12,7% bagi sperma berdensitas <5 juta/ml, sampai 25%

untuk pasien dengan densitas sperma >20 juta/ml.⁶

Kehamilan dalam kelompok yang mempunyai sperma yang sangat rendah kemungkinan disebabkan oleh kehamilan spontan. Pada penanganan lain perempuan seperti itu dapat menjadi hamil secara spontan. Mereka mempunyai fertilitas yang tinggi untuk suami mempunyai fertilitas rendah. Pada beberapa keadaan SZT atau injeksi ooplasmik sulit terjadi karena wanita dapat perlakuan faktor sub klinik yang dapat menurunkan fertilitasnya.^{6,8,9}

Sperma dari laki-laki dengan analisis semen normal berhasil fertilisasi monosperma setelah ditransfer pada 5-7 oosit dan polisperma pada 3-7 oosit. Kola dkk. melaporkan tingkat fertilisasi rendah pada transfer sperma ke oosit (23 dari 260 oosit) pada laki-laki bermasalah. Laws-King dkk. mengemukakan hasil dan menggunakan metode yang sama pula. Fishel dkk. melaporkan tingkat fertilisasi hanya 15% (55 dari 369 oosit) setelah dilakukan subzonal transfer dengan faktor lelaki bermasalah.^{1,6}

Pada studi ini tingkat polispermi lebih rendah (22 dari 959 oosit, 2,3%). Fishel dkk. melaporkan hanya 0,5% kemungkinan hal ini disebabkan reseptor sperma yang ada pada oolema membran. Polisperma terjadi ketika atau lebih sperma melekat ke oolema reseptor pada waktu yang sama. Polispermi meningkat dengan prosedur zonal transfer dikarenakan pembukaan terus menerus untuk menambah sperma motil, yang bebas untuk berenang pada medium inseminasi melalui lobang-lobang kecil pada zonal. Keberhasilan pada beberapa fertilisasi monotetris reseptor oolema pada sperma. Data dari penelitian ini juga menunjukkan kejadian polispermi adalah rendah pada

oosit segar dari pada oosit tua (1,9% dan 3,7%).¹

Bila subzonal transfer dikerjakan pada oosit umur satu hari (kelompok 2) hasilnya tidak berbeda diantara laki-laki bermasalah dengan yang tidak bermasalah. Hal ini mungkin karena batas kemampuan fusi membran oolema sehingga sperma tidak dapat penetrasi melalui zona pelusida. Dengan demikian tidak pantas untuk melakukan sub zonal injeksi pada oosit infertil yang sudah sehari mengalami kegagalan fertilisasi.^{5,6}

Yang menarik, rendahnya tingkat petenogenesis (27/959 atau 2,8%) dan pada oosit tua 4,3% dan oosit muda 2,4% keadaan ini memperkuat untuk dikembangkannya teknik mikro inseminasi dengan teknik transfer sperma ke oosit.⁶

Keberhasilan kehamilan yang rendah (8,6% setiap transfer embrio ke tubal), Fishel dkk. melaporkan bahwa kehamilan dari transfer embrio (9,7%) hal ini tidak dapat dijelaskan seberapa banyak yang berasal dari SZT atau IVF. Data dari injeksi ooplasma tidak memberikan harapan, karena kegagalan yang cukup tinggi.⁶ Lanzerdorf dkk. sudah melakukan mikro injeksi sperma ke dalam ooplasma, terbentuk 6 zigot dari 20 oosit.¹

Ada teori abnormalitas kromosom yang menyebabkan tingginya insiden abnormalitas sperma. 100 sperma yang diambil dari rongga peri vitellina yang sudah ditransfer dengan oligosperma, diuji dengan *transmission electron microscop*. Ternyata 76% akrosinnya masih utuh dan 33% sperma itu dijelaskan sepenuhnya apakah abnormalitas terjadi pada sperma atau saat perkembangan sel germinal testicular.^{1,4}

Kola dkk. melaporkan sub zonal transfer tidak berperan penting dalam

abnormalitas kromosom pada fertilisasi embrio. Abnormalitas yang ditemukan adalah aneuploid dengan separuhnya trisomi. Kita tahu bahwa trisomi adalah kasus alamiah dari abnormalitas kromosom secara alamiah.¹⁰

Martin dkk. melaporkan juga bahwa tingginya abnormalitas kromosom pada sperma manusia haloid yang ditransfer pada oosit hamsfer. Akhir-akhir ini Sthanathan dkk. tidak menemukan kontribusi di mid piece pada spindel meiosis. Hal ini berkemungkinan meningkatkan abnormalitas kromosom.¹

Kesimpulan

Mikroinjeksi sperma sub zonal mungkin merupakan teknik yang dapat dipakai untuk mengatasi pasien laki-laki bermasalah yang berat, tetapi teknik ini harus digunakan secara optimal. Bisa jadi metode yang bagus dengan konsentrasi sperma yang sangat miskin akan berhasil terjadinya fertilisasi. Meningkatnya reaksi akrosom pada sperma yang jelek adalah penting guna terjadinya fertilisasi pada metode sub zonal transfer.

Daftar Pustaka

1. Lanzendorf, SE. Malony MK. Veeck LL. Et.al. A Preclinical Evaluation of Pronuclear Formation by Micro Injection of Human Spermatozoa into Human Oocytes. Fertil Steril. 1988. 49:835-42.
2. Fishel S. Timson J. Hall J. et al. Micromanipulation dalam Reproductive Medicine Review. Smith S (Eds). 1993. 2(3): 213
3. Fishel S. Jakson P, Johnson J, et.al. Sub Zonal Insemination for the Allevation of Infertility: Fertil Steril. 1990. 54:828.
4. Baker, HWG. Management of Oligozoospermia in IVF : Invitro Vertilization, Past Present IRL Press. 1994.89.
5. Ng Sc. Bongso A. Rathnam SS. et.al. Pregna After Transfer of Sperm Under Zone Lancet.1988: 790.
6. Ng SC. Bongso A. Rathnam SS. Mikro Injection of Human Oocytes A Technigue for Severe oligo asthenoterator Zoospermia: Fertil Steril. 1991. 56: 1117-1123.
7. Cohen J. Malter H. Fertility C. et. Al. Implantation of Embryos After Partial Opening of QoeytzGna Pellucida to Facilitate Sperm Penetration: Lancet. 1988:162.
8. Yapri, Julius Chandra. Penata Laksana Program FFVT bayi tabung. Widya. 1994. 111:5-10.
9. Hanfez, E.S.E. dan Evansen RPS. et al. Human Reproduction Conception and Contraception. Harpema. New York. 1973.
10. Kola I, Lacham O, Jansen RPS. et al. Chromosomal Analysis of Human Oocytes Fertilized by Micro Injection of Spermatozoa into the Perivitelina space: Human Reprod.1990: 5:575.