

FREEZE-DRYING SPERMATOZOA SEBAGAI METODE ALTERNATIF PENYELAMATAN MATERI GENETIK HEWAN

TAKDIR SAILI

Fakultas Pertanian Universitas Haluoleo, Kampus Bumi Tridharma Anduonohu, Kendari 93232

(Makalah diterima 14 Mei 2008 – Revisi 14 November 2008)

ABSTRAK

Kriopreservasi merupakan salah satu metode yang umum digunakan untuk mengawetkan spermatozoa dimana spermatozoa dibekukan dan disimpan di dalam konteiner yang berisi nitrogen cair. Spermatozoa yang telah mengalami pembekuan masih bersifat motil setelah dicairkan kembali sehingga dapat dimanfaatkan melalui teknologi inseminasi buatan dan fertilisasi *in vitro* untuk menghasilkan embrio. Akan tetapi teknik ini membutuhkan suplai nitrogen cair yang terus-menerus dan konteiner sebagai tempat menyimpan spermatozoa yang telah dibekukan. Kemajuan di dalam teknik mikroinjeksi telah memungkinkan untuk menggunakan spermatozoa yang tidak motil lagi untuk membuahi sel telur. Oleh karena itu, metode pengawetan spermatozoa memungkinkan untuk disederhanakan sebab motilitas spermatozoa tidak dipertimbangkan lagi di dalam proses fertilisasi dibandingkan dengan metode pengawetan sebelumnya. Metode *freeze-drying* merupakan metode pengawetan spermatozoa yang ditawarkan. Melalui metode ini spermatozoa dibekukan terlebih dahulu sebelum disublimasi di dalam mesin *freeze-drying* untuk mendapatkan spermatozoa dalam bentuk kering. Spermatozoa hasil *freeze-drying* tersebut dapat disimpan pada suhu ruang atau lemari es. Beberapa penelitian memberikan laporan bahwa spermatozoa hasil *freeze-drying* tidak motil lagi tetapi masih memiliki kemampuan untuk membuahi sel telur bahkan dapat berkembang hingga melahirkan anak karena DNA spermatozoa tersebut masih utuh.

Kata kunci: Kriopreservasi, *freeze-drying*, spermatozoa, sel telur

ABSTRACT

FREEZE-DRYING SPERMATOZOA AS AN ALTERNATIVE METHOD FOR RESCUING GENETIC MATERIAL OF ANIMAL

Cryopreservation is one of the commonly methods used in spermatozoa preservation in which sperm is frozen and stored in the container of liquid nitrogen. The frozen sperm is still motile after thawing, so it is possible to use it in both artificial insemination and *in vitro* fertilization to produce an embryo. However, this technique needs a continuous supply of liquid nitrogen and a container as a place to store the frozen sperm. The advanced technique in microinjection has led the possibility of using immotile sperm to fertilize oocyte. Therefore, the sperm preservation method may be simplified because the motility of sperm has not been taken into consideration in fertilization compared to the previous method. Freeze-drying sperm is the proposed method in which the sperm is frozen and sublimated using freeze-drying machine to produce freeze-dried sperm. The freeze-dried sperm might be stored in room temperature or in refrigerator. Several reports have claimed that freeze-dried sperm is not motile but it still has capability to fertilize oocyte, even produces offspring, because its DNA remains intact.

Key words: Cryopreservation, freeze-drying, sperm, oocyte

PENDAHULUAN

Semen yang diproduksi dari seekor pejantan dengan mutu genetik unggul dapat langsung digunakan atau disimpan secara aman untuk sewaktu-waktu dapat digunakan sesuai keperluan. Penyimpanan semen harus dilakukan dengan baik sehingga spermatozoa yang terdapat di dalamnya masih mampu untuk membuahi sel telur. Hingga saat ini, metode penyimpanan semen yang paling banyak digunakan adalah metode pembekuan atau kriopreservasi.

Sejak ditemukannya metode penyimpanan spermatozoa terutama pada sapi dalam kemasan semen

beku (POLGE *et al.*, 1949), kriopreservasi spermatozoa telah menjadi salah satu pilihan dalam upaya memanfaatkan secara maksimal dan melestarikan sumber gamet hewan jantan dari kepunahan. Metode kriopreservasi ini selanjutnya diterapkan pula untuk preservasi sel embrio (WHITTINGHAM *et al.*, 1972) dan jaringan ovarium (DONNEZ dan BASSIL, 1998).

Beberapa penelitian mutakhir membuktikan bahwa spermatozoa yang tidak motil masih memiliki kemampuan untuk membuahi sel telur secara normal (KURETAKE *et al.*, 1996; WAKAYAMA *et al.*, 1998). Perlakuan yang menyebabkan rusaknya membran plasma spermatozoa seperti pemotongan ekor

(BOEDIONO, 2001), pemisahan kepala dan ekor spermatozoa dengan metode sonikasi (SAID dan NIWA, 2004; SAID *et al.*, 2003) dan pembekuan tanpa krioprotektan (SAILI dan SAID, 2005; WARD *et al.*, 2003) akan berakibat pada kematian spermatozoa. Hal ini dapat dibuktikan melalui pewarnaan dengan eosin B, dimana spermatozoa yang mati akan terwarnai karena membran plasmanya telah rusak sehingga zat warna dapat masuk ke dalam sel melewati membran sedangkan spermatozoa yang hidup tidak dapat dilewati oleh zat warna (LIU dan FOOTE, 1998).

Kenyataan ini telah membuka peluang baru dalam riset preservasi spermatozoa tanpa mempertimbangkan viabilitas spermatozoa yang dihasilkan. Beberapa penelitian membuktikan bahwa sel telur yang dibuahi oleh spermatozoa yang telah mati mampu membentuk pronukleus pada hamster (HOSHI *et al.*, 1994), atau berkembang menjadi embrio pada sapi (KESKINTEPE *et al.*, 2001) bahkan dapat berkembang menjadi anak mencit yang normal setelah ditransfer ke resipien (WAKAYAMA dan YANAGIMACHI, 1998). Hal tersebut dilakukan dengan metode fertilisasi buatan (fertilisasi mikro) yaitu memasukkan secara mekanik spermatozoon ke dalam sel telur. *Intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) adalah salah satu teknik fertilisasi mikro dengan memasukkan spermatozoon secara langsung ke dalam sitoplasma sel telur menggunakan alat manipulator mikro pada mikroskop.

Salah satu metode preservasi spermatozoa yang mempunyai keunggulan dibanding preservasi secara konvensional (kriopreservasi) adalah metode *freeze-drying*. Melalui metode ini, spermatozoa yang dihasilkan dalam bentuk kering dapat disimpan pada suhu kamar atau di dalam lemari es (4°C) sehingga tidak memerlukan suplai nitrogen cair dan wadah khusus (*liquid nitrogen container*) yang merupakan syarat mutlak pada metode pembekuan dengan N₂ cair. Selain itu, spermatozoa hasil *freeze-drying* dapat ditransportasikan dari satu tempat ke tempat lain dengan lebih mudah (WAKAYAMA dan YANAGIMACHI, 1998).

Penelitian metode preservasi spermatozoa dengan cara *freeze-drying* telah dilakukan pada beberapa pusat penelitian baik di Amerika (WARD *et al.*, 2003), Jepang (HOSHI *et al.*, 1994) maupun Australia (PANGESTU *et al.*, 2001). Metode ini pada awalnya dikembangkan untuk menjawab permasalahan dalam mengamankan sumber gamet jantan hewan percobaan (mencit) hasil rekayasa. Beberapa laboratorium yang menggunakan hewan mencit sebagai uji coba manipulasi genetik memilih untuk mengamankan sumber gamet jantan dalam kemasan spermatozoa kering daripada memelihara pejantan mencit untuk mendapatkan sumber gamet (KANEKO *et al.*, 2003; WARD *et al.*, 2003). Hal ini dapat dipahami karena pemeliharaan hewan jantan memerlukan waktu dan biaya, sedangkan

penyimpanan spermatozoa dalam kemasan beku di dalam nitrogen cair membutuhkan peralatan dan biaya tambahan.

Penulisan makalah ini bertujuan untuk memberikan informasi ilmiah tentang pengawetan spermatozoa dengan cara *freeze-drying* dan pemanfaatannya. Pada tulisan ini akan dimuat ulasan tentang metode *freeze-drying*, ketahanan inti spermatozoa dan pemanfaatan spermatozoa hasil *freeze-drying* di dalam proses fertilisasi melalui metode ICSI.

METODE FREEZE-DRYING SPERMATOZOA

Beberapa terjemahan kata *freeze-drying* ke dalam bahasa Indonesia telah diberikan, antara lain “beku kering”, “kering beku” dan “pengeringbekuan”. Dari beberapa terjemahan tersebut “pengeringbekuan” merupakan salah satu istilah yang telah dimuat di dalam kamus Biologi (RIFAI, 2002) dengan penjelasan bahwa pengeringbekuan atau *freeze-drying* merupakan suatu metode pengawetan spesimen biologi hidup dengan dehidrasi dalam keadaan beku di bawah keadaan hampa udara. Lebih luas istilah ini juga digunakan secara umum untuk menyebut proses pembuatan kemasan materi biologi, farmasi, makanan dan beberapa penyedap rasa dalam kemasan kering (ANONYMOUS, 2003) dan selanjutnya juga dipakai pada bidang preservasi spermatozoa. Dalam proses *freeze-drying*, spermatozoa akan mengalami proses pembekuan dan pengeringan untuk menghasilkan sediaan spermatozoa dalam bentuk kering. Produk ini dapat disimpan pada suhu kamar sebelum digunakan untuk keperluan fertilisasi sel telur.

Prinsip utama metode *freeze-drying* adalah menghilangkan kandungan air suatu bahan sebanyak ± 98% dengan cara sublimasi. Pada prosedur ini kandungan air suatu bahan akan mengalami dua fase perubahan, yaitu membeku dan menyublim. Pada proses pembekuan, produk dalam suatu kemasan yang kedap udara akan dipaparkan pada kondisi yang menyebabkan air dalam produk tersebut membeku, sedangkan pada proses pengeringan akan dialirkan suatu tekanan udara negatif ke dalam kemasan produk sehingga padatan air mengalami proses sublimasi (ANONYMOUS, 2003).

Penggunaan metode *freeze-drying* untuk preservasi spermatozoa telah diterapkan antara lain oleh HOSHI *et al.* (1994) yang melakukan *freeze-drying* terhadap spermatozoa manusia. Sebelum melakukan *freeze-drying*, spermatozoa terlebih dahulu diseleksi dengan cara *swim up* dengan menempatkan cairan semen pada bagian dasar tabung yang berisi medium dan spermatozoa dibiarkan berenang ke permukaan medium. Spermatozoa yang mencapai permukaan medium diambil menggunakan pipet mikro dan

dimasukkan ke dalam tabung 0,5 ml untuk dibekukan pada suhu -80°C . Proses *freeze-drying* dilakukan menurut prosedur YANAGIDA *et al.* (1991) dan KATAYOSE *et al.* (1992) dengan menggunakan mesin *freeze-drying* (model FO-5, Inaiseieido, Japan). Spermatozoa hasil *freeze-drying* tersebut kemudian disimpan di dalam desikator dengan suhu 4°C selama seminggu, selanjutnya dapat digunakan untuk penyuntikan mikro.

Selain spermatozoa manusia yang digunakan sebagai materi dalam proses *freeze-drying* juga digunakan spermatozoa hewan. KESKINTEPE *et al.* (2002) menggunakan semen beku sapi sebagai sumber spermatozoa dalam proses *freeze-drying*. Untuk membersihkan dan mendapatkan spermatozoa yang mempunyai motilitas terbaik maka semen dalam *straw* dicairkan (*thawing*) di dalam air dengan suhu 37°C selama 15 detik. Cairan semen tersebut selanjutnya dikeluarkan dan diletakkan di bagian atas 1 ml medium *Hepes-Tyrode albumin lactate pyruvate* (*Hepes-TALP*) yang mengandung masing-masing *Enhance-S-plus* (Conceptions Technologies Inc., San Diego, CA) dengan konsentrasi 45% pada lapisan atas dan 90% pada lapisan bawah tabung 15 ml. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada kecepatan $1200 \times g$ selama 15 menit. Setelah sentrifugasi, sebanyak 0,5 ml medium pada lapis bawah tabung dipipet secara perlahan dan dipindahkan ke tabung 15 ml yang lain sebelum dicampurkan dengan 2 ml medium *Hepes-Talp*. Sentrifugasi tahap kedua dilakukan pada kecepatan $300 \times g$ selama empat menit. Spermatozoa hasil sentrifugasi tersebut selanjutnya diencerkan menggunakan *modified Dulbecco modified Eagle medium* (DMEM, 10315-026; Gibco) hingga mencapai konsentrasi spermatozoa $0,5 \times 10^5/\text{ml}$. Selanjutnya, sebanyak 100 μl suspensi spermatozoa dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1 ml dan dicelupkan ke dalam nitrogen cair. Tabung tersebut kemudian dikeluarkan dari nitrogen cair dan dipasang pada mesin *freeze-drying* (FTS System Inc., Stone Ridge, NY) dengan suhu *pre cooled* -47°C dan *inlet pressure* 190×10^3 mbar. Proses ini berlangsung selama 12 – 18 jam. Kemasan tersebut ditutup rapat dan disimpan pada suhu 4°C selama satu sampai tiga bulan sebelum digunakan untuk proses fertilisasi melalui metode ICSI.

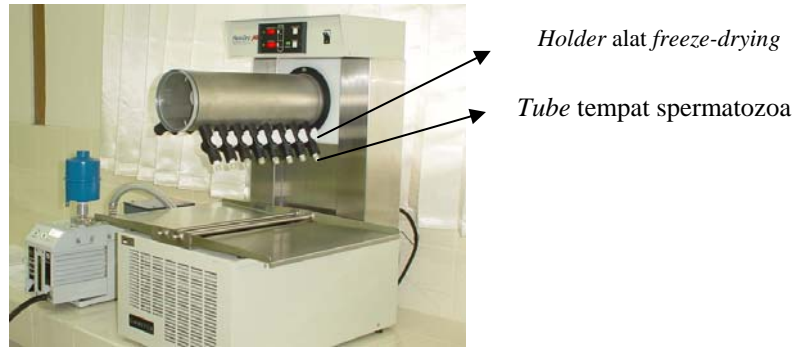
KANEKO *et al.* (2003) menggunakan spermatozoa mencit sebagai materi dalam proses *freeze-drying*. Prosedur *freeze-drying* tersebut diawali dengan mengeluarkan spermatozoa yang masih berbentuk pasta dari epididimis lalu dimasukkan secara perlahan ke bagian dasar tabung yang mengandung 1 ml larutan penyangga EGTA Tris-HCl. Selanjutnya tabung tersebut dihangatkan pada suhu 37°C selama 10 menit agar spermatozoa mengurai dari kelompoknya dan bergerak ke arah permukaan larutan. Hal ini merupakan

salah satu bentuk seleksi spermatozoa dimana spermatozoa yang mampu mencapai permukaan larutan merupakan spermatozoa yang mempunyai motilitas terbaik. Kemudian, sebanyak 800 μl larutan yang berada di bagian atas tabung diambil dan dimasukkan ke dalam ampul kaca berleher panjang. Dalam proses *freeze-drying*, ampul yang berisi spermatozoa tersebut dicelup terlebih dahulu ke dalam nitrogen cair selama 20 detik lalu dihubungkan dengan mesin *freeze-drying* (*Freeze-Dry Systems*, Labconco, Kansas City, MO, Gambar 1). Empat jam kemudian ampul ditutup dengan cara membakar bagian ujung ampul agar tidak terjadi kontaminasi dengan udara luar. Diupayakan tekanan udara yang berada pada ampul sekitar $30 - 33 \times 10^{-3}$ mbar pada saat menutup ampul tersebut. Selanjutnya ampul tersebut disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

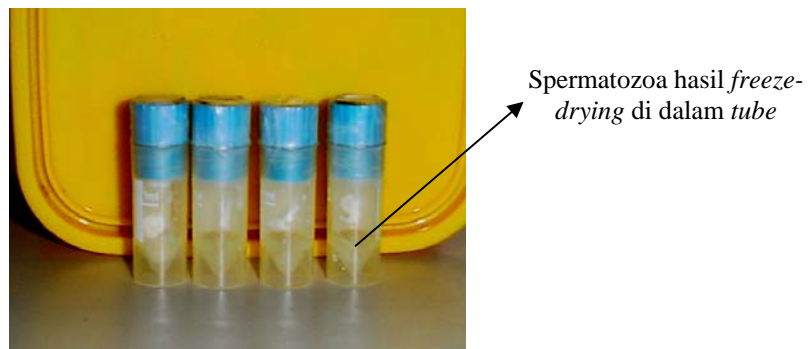
SAILI *et al.* (2007) melakukan *freeze-drying* pada spermatozoa domba dengan menerapkan metode KANEKO *et al.* (2003) yang dimodifikasi. Metode tersebut secara jelas dapat diuraikan sebagai berikut: Spermatozoa terlebih dahulu dibebaskan dari plasmanya dengan menggunakan metode *swim up*. Sebanyak 100 μl (2×10^9 spermatozoa/ml) semen domba dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml kemudian ditambahkan secara perlahan-lahan medium pelarut *ethylene glycol-bis[beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (EGTA) (Sigma), atau *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) (Sigma) pH 8,0 sebanyak 1,3 ml. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 10 menit agar spermatozoa dapat berenang ke permukaan medium. Fraksi spermatozoa yang berada di bagian atas medium diambil secara perlahan-lahan dan dipindahkan masing-masing sebanyak 100 μl ke dalam *tube* berpenutup ulir 1,5 ml (*Cryo-tube*, Greiner, Gambar 2). *Tube* tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam nitrogen cair hingga proses *freeze-drying* dimulai. Proses tersebut diawali dengan pemasangan *tube* dan selanjutnya mesin dijalankan dan proses pengeringbekuan berjalan hingga terbentuk tepung spermatozoa di dalam *tube* tersebut. *Tube* selanjutnya dilepas dari mesin, ditutup rapat, divakum menggunakan *syringe* 10 ml dan disimpan di dalam lemari es hingga digunakan (Gambar 3).

DAYA TAHAN INTI SPERMATOZOYA

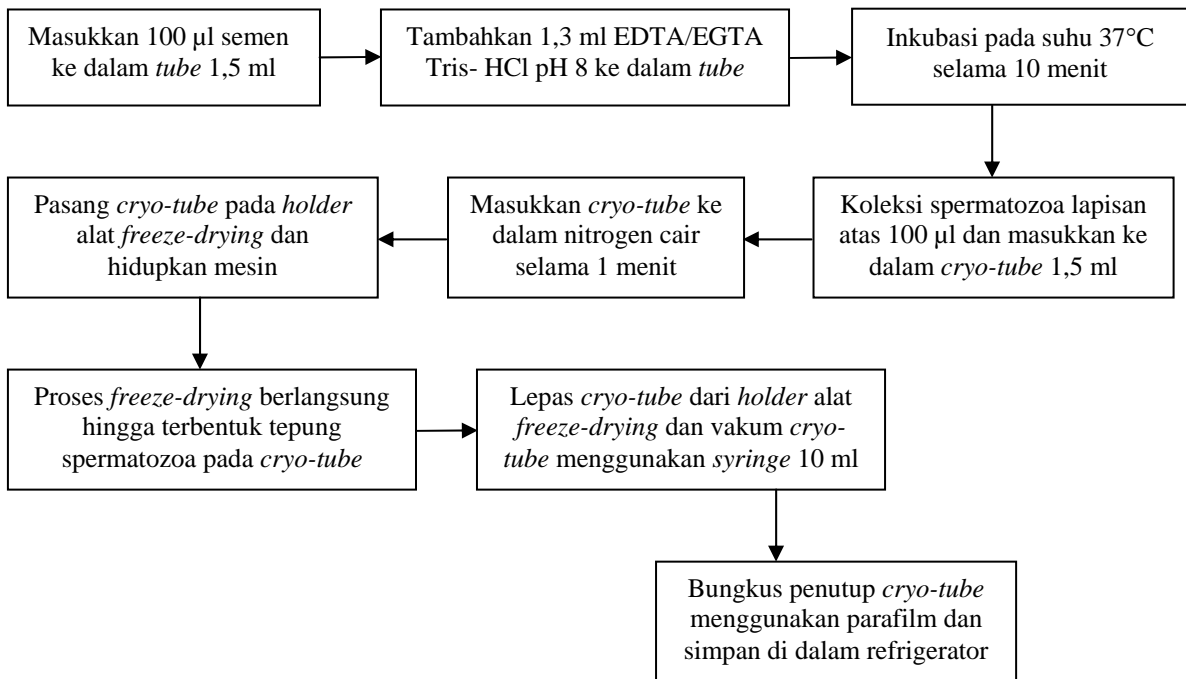
Pada tahap akhir proses spermatogenesis, histon (*somatic histone*) yang berasosiasi dengan DNA pada inti spermatozoa akan digantikan oleh suatu protein transisi dan selanjutnya akan terbentuk histon atau protamin (keduanya adalah protein sederhana yang secara bergantian menstabilkan struktur inti spermatozoa selama spermatogenesis) yang spesifik untuk spermatozoa. Penggantian protein ini dianggap bertanggungjawab terhadap penghambatan proses



Gambar 1. Mesin *Freeze-drying*



Gambar 2. Tube tempat spermatozoa hasil *freeze-drying*



Gambar 3. Skema metode *freeze-drying* spermatozoa yang dikembangkan oleh SAILI *et al.* (2007)

transkripsi pada inti dan pengompakan kromatin (*chromatin compaction*). Pada saat spermatozoa melewati epididimis, residu sistein pada protamin akan membentuk ikatan sulfida satu sama lain (CALVIN dan BEDFORD, 1971). Terbentuknya ikatan ini menyebabkan daya tahan inti spermatozoa semakin tinggi terhadap pengaruh fisik dan kimia (MEISTRICH *et al.*, 1976). Daya tahan inti spermatozoa terhadap suhu rendah telah dibuktikan dengan lahirnya beberapa anak hasil inseminasi dengan menggunakan spermatozoa beku (WATSON, 1990). Selain itu, spermatozoa juga tahan terhadap suhu panas, bahkan spermatozoa yang ditempatkan pada suhu 90°C selama 30 menit pun masih mampu membentuk pronukleus (YANAGIDA *et al.*, 1991). Daya tahan inti spermatozoa terhadap proses pengeringan telah dibuktikan melalui *freeze-drying* spermatozoa manusia yang dilanjutkan dengan penyimpanan di dalam desikator selama beberapa bulan masih mampu mendukung pembentukan pronukleus (KATAYOSE *et al.*, 1992).

KANEKO *et al.* (2003) mengatakan bahwa proses *freeze-drying* dapat merusak komponen struktural spermatozoa. Semua spermatozoa terbukti mati setelah mengalami *freeze-drying* yang menggambarkan bahwa membran plasma spermatozoa mengalami kerusakan yang berat. Selain itu, beberapa spermatozoa juga mengalami pemisahan antara bagian kepala dan ekor. Hal ini mungkin menunjukkan bahwa bagian pertemuan ekor dan kepala spermatozoa sangat rapuh sehingga dengan sedikit guncangan fisik akan terputus. Namun demikian, integritas genetik spermatozoa masih tetap terjaga yang dibuktikan melalui pemeriksaan kromosom dan kemampuan spermatozoa mendukung perkembangan sel telur.

KUSAKABE *et al.* (2001) melaporkan bahwa perkembangan sel telur pada hewan kecil yang disuntik spermatozoa hasil *freeze-drying* dapat berlangsung dengan baik. Selain itu, juga diperoleh bukti adanya aktivasi spontan pada sel telur (hampir 90%) setelah penyuntikan kepala spermatozoa dilakukan. Hal ini menunjukkan bahwa molekul yang menyebabkan aktivasi pada spermatozoa tersebut tidak mengalami kerusakan pada proses *freeze-drying*.

Spermatozoa kecil yang dilarutkan dalam pengencer yang tidak mengandung krioprotektan, lalu dicelup ke dalam nitrogen cair ternyata semua spermatozoa mati, hal ini dibuktikan dengan metode pewarnaan. Namun demikian, pertumbuhan embrio yang normal dapat diperoleh dari oosit yang disuntik dengan kepala spermatozoa yang mati tersebut. Hal ini membuktikan bahwa asumsi tentang sel hidup dan nukleus hidup tidak sama (WAKAYAMA dan YANAGIMACHI, 1998).

Untuk mengoptimalkan upaya perlindungan terhadap inti spermatozoa selama proses *freeze-drying*, KANEKO *et al.* (2003) menggunakan larutan penyangga

ethylene glycol-bis [beta-aminoethyl ether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA). Tris-HCl sebagai medium pelarut spermatozoa kecil. EGTA berperan menekan fungsi kation bivalen yang mendukung kerja enzim endonuklease, sehingga proses pemutusan ikatan fosfodiester pada DNA oleh enzim endonuklease tidak terjadi (CLARK dan EICHORN, 1974). Selain itu, perlindungan terhadap inti spermatozoa juga dapat dilakukan dengan mengatur pH medium pelarut spermatozoa. Enzim DNase I berfungsi optimal pada pH 7 dan stabil pada pH 5-6 sehingga jika dipapar pada medium dengan pH tinggi aktivitas enzim tersebut dalam merusak struktur DNA (KUNITZ, 1950). KANEKO *et al.* (2003) melaporkan bahwa pelarut spermatozoa pada saat *freeze-drying* dengan pH 8,0 akan mampu mempertahankan integritas kromosom dan perkembangan spermatozoa lebih lanjut.

PEMANFAATAN SPERMATOZOA HASIL *FREEZE-DRYING* UNTUK FERTILISASI MELALUI METODE ICSI

Pada awalnya penggunaan spermatozoa hasil *freeze-drying* pada manusia dan sapi memberikan hasil yang tidak menggembirakan, namun penggunaan teknik ICSI telah mengubah pendapat tersebut dengan lahirnya beberapa hewan hasil ICSI yang menggunakan spermatozoa hasil *freeze-drying*. Nampaknya spermatozoa yang telah mengalami proses *freeze-drying* walaupun tidak hidup lagi tetapi masih memiliki integritas inti sel yang terjaga sehingga dapat mendukung perkembangan sel telur lebih lanjut (KESKINTEPE *et al.*, 2002).

Melalui prosedur ICSI, spermatozoa yang disuntikkan ke dalam sel telur tidak perlu dalam kondisi hidup atau bergerak (*motil*) untuk mendukung perkembangan embrio yang normal. Hal ini telah dibuktikan dengan lahirnya dua ekor anak sapi yang normal dari hasil penyuntikan sel telur menggunakan spermatozoa *immotile* yang dibekukan tanpa krioprotektan (GOTO *et al.*, 1990). Bukti lain dikemukakan oleh SAID dan NIWA (2004) yang melaporkan bahwa spermatozoa yang diidentifikasi mati dengan uji viabilitas menggunakan *sperm viability kit*, setelah disuntikkan ke dalam sel telur masih mampu melakukan pembuahan normal dan selanjutnya tumbuh mencapai tahap blastosis. Selain itu, ICSI yang dilakukan pada manusia umumnya menggunakan spermatozoa yang terlebih dahulu diimobilisasi untuk mempermudah pelaksanaan penyuntikan sehingga keberhasilan ICSI secara nyata dapat ditingkatkan. Hal ini mungkin disebabkan semakin cepat membran plasma spermatozoa pecah maka semakin cepat pula proses penyatuan inti spermatozoa dengan sitoplasma oosit. Imobilisasi spermatozoa umumnya dilakukan dengan memotong ekor spermatozoa menggunakan

pipet suntik dengan cara menekan sambil menggores ekor spermatozoa pada dasar cawan petri. Hal ini dilakukan sesaat sebelum penyuntikan agar spermatozoa menjadi tidak bergerak (*immotile*) sehingga operator dapat dengan mudah memasukkan spermatozoa ke dalam pipet suntik untuk selanjutnya disuntikkan ke dalam sel telur (BOEDIONO, 2001).

KESIMPULAN

Metode *freeze-drying* spermatozoa dapat dijadikan metode yang efektif dan murah untuk mengawetkan spermatozoa dalam rangka penyelamatan sumber genetik hewan terutama hewan eksotik dan hewan kesayangan serta hewan yang mempunyai nilai ekonomis tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

ANONYMOUS. 2003. The freeze-drying process. <http://www.commercialfreezedry.co.uk/process.html>. (9 Juni 2003).

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.

CALVIN, H.I. and J.M. BEDFORD. 1971. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.* 13: 65 – 75 (Suppl.).

CLARK, P. and G.L. EICHHORN. 1974. A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* 13: 5098 – 5102.

DONNEZ, J. and S. BASSIL. 1998. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum. Reprod.* 4: 248 – 259.

GOTO, K., A. KINOSHITA, Y. TAKUMA and K. OGAWA. 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 127: 517 – 520.

HOSHI, K., K. YANAGIDA, H. KATAYOSE and H. YAZAWA. 1994. Pronuclear formation and cleavage of mammalian eggs after microsurgical injection of freeze-dried sperm nuclei. *Zygote* 2: 237 – 242.

KANEKO, T., D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 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., J. MATSUDA and R. YANAGIMACHI. 1992. The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol. Reprod.* 47: 277 – 284.

KESKINTEPE, L., A. HASSAN, I. KHAN and S.L. STICE. 2001. Bovine embryo development after lyophilized sperm injection. *Theriogenology* 55: 505 (Abstract).

KESKINTEPE, L., G. PACHOLCZYK, A. MACHNICKA, K. NORRIS, M.A. CURUK, I. KHAN and B.G. BRACKETT. 2002. Bovine blastocyst development from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Biol. Reprod.* 67: 409 – 415.

KUNITZ, M. 1950. Crystalline deoxyribonuclease. II. Digestion of thymus nucleic acid (deoxyribonucleic). The kinetics of the reaction. *J. Gen. Physiol.* 33: 363 – 377.

KURETAKE, S., Y. KIMURA, K. HOSHI and R. YANAGIMACHI. 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm head. *Biol. Reprod.* 55: 789 – 795.

KUSAKABE, H., M.A. SZCZYGIEL, D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 2001. Maintenance of genetic integrity in frozen and freeze-dried mouse spermatozoa. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241517598. (6 Juni 2003).

LIU, Z. and R.H. FOOTE. 1998. Bull sperm motility and membrane integrity in media varying in osmolality. *J. Dairy Sci.* 81: 1868 – 1873.

MEISTRICH, M.L., B.O. REID and W.J. BARCELONA. 1976. Changes in sperm nuclei during spermatogenesis and epididymal maturation. *Exp. Cell. Res.* 99: 72 – 78.

PANGESTU, M., L. LEWIN, J. SHAW, O. LACHAM-KAPLAN and A. TROUNSON. 2001. Evaluation of embryo development after ICSI with dried mouse spermatozoa. *Theriogenology* 55: 508 (Abstract).

POLGE, C., A.U. SMITH and A.S. PARKES. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.

RIFAI, M.A. 2002. *Kamus Biologi*. Edisi ke-2. Balai Pustaka, Jakarta.

SAID, S. dan K. NIWA. 2004. Pembuahan dan perkembangan sel telur tikus setelah disuntik spermatozoa mati. *Hayati* 11: 135 – 138.

SAID, S., T. SAILI dan B. TAPPA. 2003. Pengaktifan dan pembuahan sel telur tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati* 10: 96 – 99.

SAILI, T. and S. SAID. 2005. The ability of rat cauda epididymal sperm cryopreserved in liquid nitrogen without cryoprotectant to form pronucleus. *J. Vet.* 4: 78 – 84.

SAILI, T., M.A. SETIADI, S. AGUNG PRIYONO dan A. BOEDIONO. 2007. Injeksi spermatozoa domba hasil peneringbekuan ke dalam sel telur menggunakan teknik *Intracytoplasm Sperm Injection* (ICSI). *J. Vet.* 8: 32 – 39.

WAKAYAMA, T. and R. YANAGIMACHI. 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotech.* 16: 639 – 641.

- WAKAYAMA, T., D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 1998. Production of normal offspring from mouse oocytes injected with spermatozoa cryopreserved with or without cryoprotection. *J. Reprod. Fertil.* 112: 11 – 17.
- WARD, M.A., T. KANEKO, H. KUSAKABE, J.D. BIGGERS, D.G. WHITTINGHAM and R. YANAGIMACHI. 2003. Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol. Reprod.* 69: 2100 – 2108.
- WATSON, P.F. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. *In: Marshall's Physiology of Reproduction.* LEMMING (Ed.). Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 747 – 869.
- WHITTINGHAM, D.G., S.P. LEIBO and P. MAZUR. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -296°C . *Science* 178: 411 – 414.
- YANAGIDA, K., R. YANAGIMACHI, S.D. PERREAULT and R.G. KLEINFELD. 1991. Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.* 44: 440 – 447.