



Pembentukan Pronukleus Jantan dan Betina pada Mencit (*Mus musculus*) setelah Terjadinya Fertilisasi

Formation of male and female pronucleus in mouse (Mus musculus) based on time after fertilization

DINI ROSA SITIAYU¹, SUTARNO^{1,♥}, SYAHRUDDIN SAID²

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta 57126.

² Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong-Bogor 16911.

Diterima: 1 Oktober 2005. Disetujui: 11 Nopember 2005.

ABSTRACT

Pronuclei are nuclei from male or female before *syngami*. The information about time of fertilization *in vivo* in animals was limited, especially in formation of pronuclei. This study have purpose to know the timing of sperm and egg nuclei changes at the time *in vivo* fertilization until formed male and female pronuclei. The female mouse DDY age 6-8 weeks were super ovulated through injection 5 IU PMSG and hCG (48 h after PMSG) per mouse intraperitoneally. The female mouse was mated with male from same species in proportion male: female = 1:1. The eggs were collected on 4, 6, 8, and 10 h after fertilization with 0 h is 12 h after hCG injection with shallow cut of fertilization bladder of female mouse tuba Fallopian. The shallow cut was treated in PBS media supplemented by 3% BSA and 0.1% hyaluronidase; the eggs were washed in same media without hyaluronidase. The eggs were fixed with glutaraldehyde 2.5% in PBS, the eggs were drawn in neutral formalin 10%, dehydration with ethanol 95% and stained with lacmoid 0.25% in acetic acid 45%, the eggs were washed with using acetoglycerol and then observation about development of sperm and egg nuclei morphology. Development of mouse egg nuclei achieve to female pronuclei phase 185 (95%±6) was occur on 8 h after *in vivo* fertilization, development of mouse sperm nuclei achieve to male pronuclei phase 185 (96%±4) was occur on 8 h after *in vivo* fertilization. In the present study, we found some of eggs like *unfertilized* eggs, polysperm, and *parthenogenesis* at the fertilization *in vivo*.

♥ Alamat korespondensi:

Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126
Tel. & Fax.: +62-271-663375.
e-mail: biology@mipa.uns.ac.id

Keywords: sperm nuclei, egg nuclei, pronucleus, *in vivo*, mouse.

PENDAHULUAN

Bioteknologi reproduksi saat ini telah mengalami perkembangan yang pesat dan penelitian-penelitian yang telah dilakukan semuanya membawa suatu manfaat untuk mengatasi masalah-masalah yang ditemui dalam proses reproduksi. Teknik-teknik reproduksi seperti ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*), IVF/IVM (*In Vitro Fertilization/Maturation*),

transfer gen atau embrio, maupun kloning sel somatik sekarang ini banyak melibatkan pronukleus yang merupakan proses paling awal pada fertilisasi setelah terjadinya kontak antara spermatozoa dengan sel telur.

Informasi tentang waktu dari tahap fertilisasi pada manusia maupun hewan masih terbatas karena waktu bergabungnya gamet tidak diketahui saat pre-ovulasi sampai oosit terakhir yang diinseminasi. Hal ini yang menjadi tujuan

penelitian dari Nagy *et al* (1994) yang diikuti oleh Birler *et al* (2001) untuk menginvestigasi kejadian atau peristiwa-peristiwa awal dari fertilisasi dan untuk menentukan waktu yang paling awal untuk pembentukan pronukleus pada kambing. Secara umum kebanyakan penelitian yang sudah dilakukan hanya memaparkan pembentukan pronukleus jantan setelah proses-proses tertentu seperti ICSI, IVF, inseminasi, atau mikroinjeksi tetapi tentang kapan waktu yang pasti secara tepat pembentukan pronukleus jantan dan pronukleus betina setelah spermatozoa kontak dengan sel telur melalui proses alamiah masih menjadi pertanyaan. Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah ada dan informasi-informasi waktu tentang pembentukan pronukleus jantan yang telah dipaparkan, maka penelitian tentang pembentukan pronukleus jantan dan pronukleus betina secara alami berdasarkan waktu setelah terjadinya fertilisasi perlu dilakukan guna mengetahui waktu pasti terbentuknya kedua pronukleus tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui waktu perubahan inti sperma dan inti sel telur pada saat fertilisasi secara alamiah sampai menjadi pronukleus jantan dan betina serta kejadian pada sel telur setelah fertilisasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Hewan percobaan. Hewan yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit betina strain DDY berumur 6-8 minggu.

Media koleksi. Media yang digunakan untuk mengoleksi sel telur adalah PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 5 ml, 3% BSA (*Bovine Serum Albumin*), dan 0,1% *hyaluronidase*.

Bahan fiksasi. Bahan kimia untuk memfiksasi adalah *glutaraldehyde* 2,5% dalam PBS (*Phosphate Buffered Salline*) dan *formaldehyde* 10%.

Bahan dehidrasi. Bahan kimia yang digunakan untuk dehidrasi sel telur adalah etanol 95%.

Bahan pewarnaan dan pencuci. Bahan kimia yang digunakan untuk pewarnaan adalah *lacmoid* 0,25% dalam asam asetat 45% dan bahan kimia yang digunakan untuk mencuci sel telur adalah *acetoglycerol*.

Hormon. Hormon untuk superovulasi adalah PMSG (*pregnant mare's serum gonadotropin*) dan hCG (*human chorionic gonadotropin*).

Bahan kimia lainnya. alkohol 70%, paraffin, dan vaselin.

Cara kerja

Superovulasi. Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit betina strain DDY berumur 6-8 minggu. Mencit betina tersebut disuperovulasi dengan suntikkan 5 IU PMSG per ekor dan 5 IU hCG per ekor secara *intraperitoneal*. Setiap perlakuan waktu digunakan sampel dua ekor mencit betina per-ulangan (\pm 32 ekor mencit betina). Waktu penyuntikan PMSG adalah pada pertengahan siklus terang, yaitu pada jam 12.00, sedangkan penyuntikan hCG dilakukan 48 jam setelah PMSG (Hogan *et al.*, 1986).

Fertilisasi. Mencit betina setelah disuntik dengan 5 IU PMSG dan 5 IU hCG per ekor secara *intraperitoneal*, masing-masing dikawinkan dengan mencit jantan di dalam kandang terpisah dengan perbandingan jantan: betina = 1:1. Sel telur dipanen pada jam yang telah ditentukan (4, 6, 8, dan 10 jam) pasca fertilisasi, dengan 0 jam adalah 12 jam pasca hCG (saat ovulasi) dengan menoreh kantung fertilisasi tuba Fallopi mencit betina yang dimatikan secara dislokasi servikalis. Penorehan dilakukan di dalam media PBS (Gibco, BRL, USA) yang disuplementasi 3% BSA (*Bovine Serum Albumin*), dan 0,1% *Hyaluronidase* (Sigma, USA) untuk melepaskan sel-sel kumulus. Sel telur yang telah bersih dari kumulus, dicuci dalam media yang sama tanpa *hyaluronidase*.

Fiksasi dan pewarnaan. Sel telur yang telah difertilisasi, dilakukan fiksasi. Sel telur diletakkan diatas kaca obyek, lalu ditutup dengan kaca penutup yang memiliki bantalan terbuat dari parafin dan vaselin (1:9) di keempat sudutnya. Sampel difiksasi dengan *glutaraldehyde* 2,5% dalam PBS pH 7,4, selanjutnya dicelup ke dalam formalin netral 10% selama 4 jam pada suhu ruangan. Sampel didehidrasi dengan etanol 95% dan diwarnai dengan *lacmoid* 0,25% dalam asam asetat 45%, kemudian dicuci dengan mengalirkan *Acetoglycerol* pada sampel.

Pengamatan. Sitologi sel telur hasil fertilisasi diamati menggunakan mikroskop fase kontras pembesaran 400X. Perkembangan morfologi inti sel telur yang diamati meliputi metafase II, proses pelepasan badan kutub II (anafase II, telofase II), pre pronukleus betina, pronukleus betina, karyogami dan mitosis. Perkembangan inti spermatozoa yang diamati meliputi kondensasi, dekondensasi kepala spermatozoa, pre pronukleus jantan, pronukleus jantan, karyogami dan mitosis.

Analisis data

Data hasil pengamatan perkembangan morfologi inti sel telur dan sel sperma disajikan

secara deskriptif dengan menggunakan rata-rata persentasi \pm standard deviasi ($\% \pm$ SD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Status inti spermatozoa

Hasil penelitian tentang status inti spermatozoa disajikan pada Tabel 1.

Kondensasi

Status kondensasi spermatozoa terjadi ketika penggabungan dengan plasma membran sel telur, tutup atau seludang nuklear spermatozoa terpisah dan mengeluarkan kromatin (Hafez, 1993). Perbedaan struktur inti spermatozoa adalah terletak pada perubahan kepala spermatozoa. Kepala spermatozoa bersatus kondensasi jika baru memasuki sel telur (Rugh, 1971).

Dari hasil penelitian ini didapatkan status inti spermatozoa berstatus kondensasi apabila kepala spermatozoa masih dalam bentuk kait, seperti bentuk spermatozoa pada mencit dan belum menggebug atau membesar (Gambar 1). Status ini didapatkan pada saat kepala spermatozoa baru saja memasuki sel telur, tetapi ada keadaan dimana kepala spermatozoa sudah masuk ke dalam sel telur tetapi statusnya tidak berubah menjadi dekondensasi. Hal ini terkait dengan kandungan GSH (*Glutathionine Stymulating Hormon*) yang terdapat dalam sel telur. Pada proses spermiogenesis saat transformasi spermatid menjadi spermatozoa, spermatozoa teroksidasi secara fisik dan kimiawi inti spermatozoa menjadi stabil dengan terbentuknya ikatan disulfid (-S-S-) pada inti

protamin (Calvin dan Bedford, 1971). Pada saat setelah fertilisasi proses balik terjadi, ikatan disulfid direduksi oleh GSH sehingga protamin inti spermatozoa berubah berikatan -S-H- (*thiol*) dan terjadilah proses dekondensasi. Apabila kandungan GSH dalam sel telur tidak cukup untuk mereduksi ikatan disulfid tersebut, maka status inti spermatozoa masih tetap dalam tahap kondensasi dan tidak terjadi pembuahan (Funahashi *et al.*, 1995).

Dekondensasi

Dekondensasi sebenarnya adalah perbesaran volume (*expansion in volume*) dari inti sperma yang benang kromatinnya mulai memisah (Poccia, 1989). Perbesaran atau pembengkakan kepala spermatozoa merupakan pembengkakan dari inti spermatozoa yang diasumsikan sebagai proses kelengkapan reduksi dari ikatan disulfid dan pembentukan inti spermatozoa sebagai sebuah ikatan dari rantai-rantai nukleoprotein (Austin dan Short, 1982). Setelah spermatozoa memfertilisasi sel telur dan masuk ke dalam sitoplasmanya, intinya harus berdekondensasi sehingga kromosomnya bisa berpasangan dengan kromosom dari pronukleus betina nantinya. Prasyarat dari dekondensasi adalah ikatan disulfid harus direduksi.

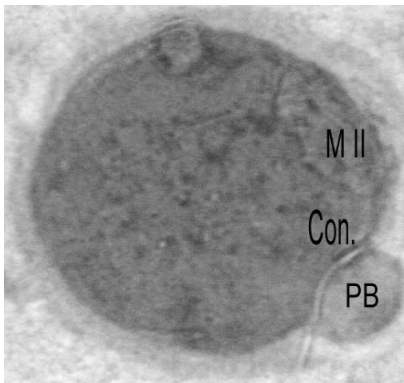
Dalam ooplasma, ikatan disulfid ini direduksi secara cepat. Agen pereduksi tersebut adalah *glutathione*. Saat reduksi ikatan disulfid terjadi, inti spermatozoa berdekondensasi dan material intinya dapat berinteraksi dengan inti material betina (Senger, 1999). Peningkatan *glutathione* dipercaya menjadi prasyarat untuk dekondensasi

Tabel 1. Status inti spermatozoa.

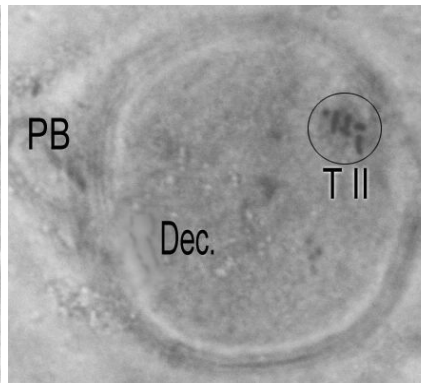
Waktu (jam)	Jumlah sel telur	Status inti spermatozoa ($\% \pm$ SD)			
		Kondensasi	Dekondensasi	Pre pronukleus	Pronukleus
4	110	8 \pm 3	86 \pm 4	0	0
6	101	1 \pm 2	6 \pm 6	86 \pm 5	0
8	185	1 \pm 2	0	0	96 \pm 4
10	112	0	0	0	3 \pm 4

Tabel 2. Status inti sel telur.

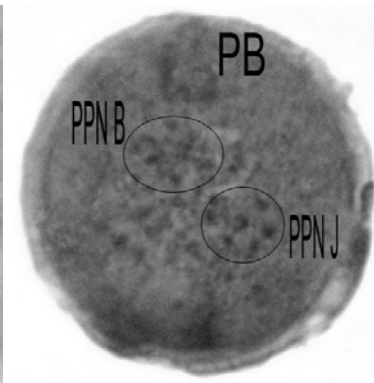
Waktu (jam)	Jumlah sel telur	Status inti sel telur ($\% \pm$ SD)				
		Metafase II	Anafase II	Telofase II	Pre pronukleus	Pronukleus
4	110	14 \pm 4	0	86 \pm 4	0	0
6	101	7 \pm 5	0	6 \pm 6	86 \pm 5	0
8	185	3 \pm 3	0	0	2 \pm 4	95 \pm 6
10	112	0	0	0	0	3 \pm 4



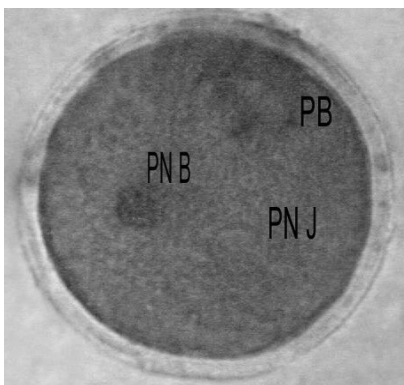
Gambar 1. Tahap kondensasi kepala spermatozoa dan metafase II sel telur. Keterangan: M II = metafase II, Con = kondensasi PB = polar bodi.



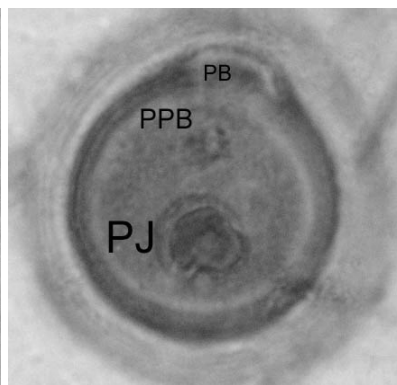
Gambar 2. Tahap decondensasi kepala spermatozoa dan telofase II sel telur. Keterangan: T II = telofase II, Dec = decondensasi, PB = polar bodi.



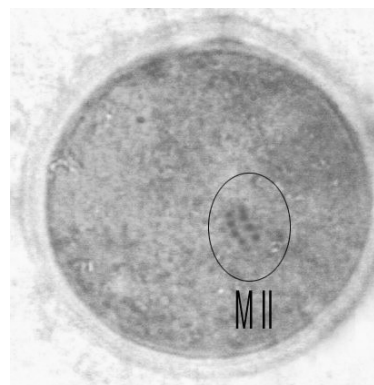
Gambar 3. Tahap pre pronukleus jantan dan pre pronukleus betina. Keterangan: PPNB = pre pronukleus betina, PPNJ = pre pronukleus jantan, PB = polar bodi.



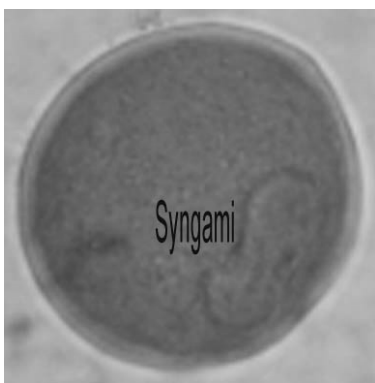
Gambar 4. Pronukleus jantan dan betina. Keterangan: PNB = pronukleus betina, PNJ = pronukleus jantan, PB = polar bodi.



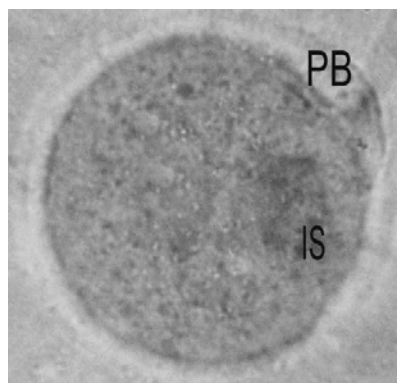
Gambar 5. Pronukleus jantan dan betina. Keterangan: PPB = pre pronukleus betina, PJ = pronukleus jantan, PB = polar bodi.



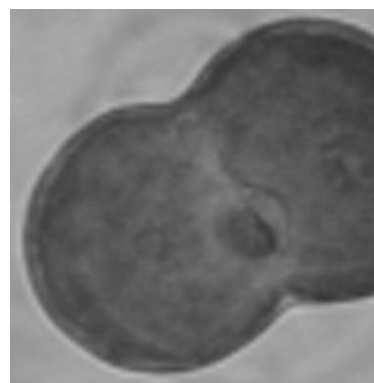
Gambar 6. Metafase II sel telur (*Unfertil*). Keterangan: M II = Metafase II.



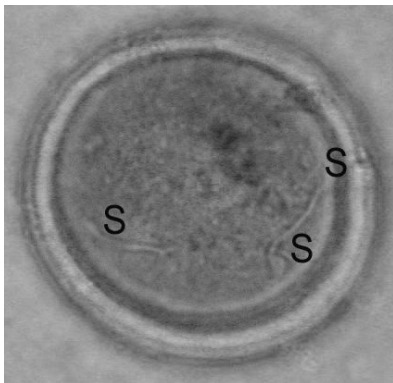
Gambar 7. Syngami.



Gambar 8. Satu sel. Keterangan: PB = polar bodi, IS = inti sel.



Gambar 9. Dua sel.



Gambar 10. Polispermi. Keterangan: S = Spermatozoa

inti sperma, dan konsekuensinya untuk menginduksi pembentukan pronukleus jantan pada mencit. Waktu dekodensasi inti sperma dan pembentukan pronukleus tergantung dari ikatan S-S dalam inti sperma (Perreault *et al.*, 1987) yang akan direduksi menjadi protamin berikatan -S-H-. Protamin memfasilitasi dekodensasi dari kromatin inti spermatozoa yang dibutuhkan sebagai syarat dari inti sel spermatozoa yang matang (Carlson, 1988).

Selain persyaratan reduksi ikatan disulfid dan kandungan GSH dalam sel telur, permeabilitas membran sperma dengan perangkat fisik juga mempunyai peran dalam memfasilitasi dekodensasi dan pembentukan pronukleus. Dekodensasi dari inti sperma dan pembentukan pronukleus jantan dipengaruhi oleh stabilitas struktural dari inti sperma (Rho *et al.*, 1998).

Dari hasil penelitian, kepala spermatozoa yang berdekondensasi mempunyai ciri-ciri kepala membengkak (ukuran atau volume kepala spermatozoa membesar), tampak mengeluarkan cahaya atau berpendar, kepala spermatozoa tidak menyerupai bentuk kait (Gambar 2). Pada tahap dekodensasi ini juga menunjukkan membran disekeliling spermatozoa yang menghilang secara cepat, mengikuti berakhirnya kromatin (Karp dan Berril, 1981) yang berubah menjadi benang-benang kromosom (Yatim, 1982). Harjanti Sebagian besar status inti spermatozoa pada empat jam setelah fertilisasi *in vivo* berada dalam tahap dekodensasi.

Pre pronukleus jantan

Kromatin yang berubah menjadi kromosom kemudian terbentuk gelembung-gelembung kecil mengelilinginya (Yatim, 1982). Gelembung-gelembung tersebutlah yang disebut pre

pronukleus jantan. Gelembung-gelembung kecil tersebut adalah penampakan dari sejumlah nukleoli jantan yang besar atau membengkak dan pada akhirnya bergabung membentuk pronukleus jantan (Rothschild, 1956). Dari hasil penelitian ini, proporsi spermatozoa berubah ke tahap pre pronukleus jantan yang diperoleh enam jam setelah fertilisasi secara *in vivo* seperti yang tergambarkan pada hasil penelitian (Gambar 3). Pre pronukleus adalah suatu struktur sebelum struktur pronukleus. Struktur ini digambarkan sebagai kumpulan bulatan-bulatan kecil.

Pronukleus jantan

Pembentukan pronukleus jantan adalah dimulai dari berakhirnya kromatin (Karp dan Berril, 1981), yang berubah menjadi benang-benang kromosom kemudian terbentuk gelembung-gelembung kecil mengelilinginya (Yatim, 1982), intinya membengkak membentuk pronukleus jantan (Langman dan Sadler, 1988). Dari hasil penelitian, pronukleus jantan terlihat sebagai suatu struktur bulatan kecil di tengah sel telur, ciri lain yang menandakan adalah didekatnya pasti ada bekas ekor spermatozoa yang disebut *perforatorium* (Gambar 4). Pronukleus jantan akan selalu ditemukan dekat bagian tengah dari sel, menunggu kelengkapan proses pematangan sebelum bergabung dengan pronukleus betina (Rugh, 1971). Pronukleus jantan biasanya lebih besar daripada pronukleus betina (Johnson dan Everitt, 1988). Pada penelitian ini kelihatannya pronukleus jantan terbentuk lebih dahulu daripada pronukleus betina karena struktur inti spermatozoa sudah mulai membentuk suatu bulatan penuh seperti struktur pronukleus. Struktur inti sel telur masih berada pada fase pre pronukleus betina yang digambarkan seperti kumpulan bulatan-bulatan kecil (Gambar 6), hal ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh Perreault *et al* (1987). Tahap pronukleus jantan mulai terbentuk setelah delapan jam setelah fertilisasi secara *in vivo*.

Pergerakan pronukleus jantan dipengaruhi oleh fungsi aster spermatozoa yang berguna untuk penggabungan genom jantan dan betina (Nakamura *et al.*, 2001). Selain itu, sentriol dan mikrotubul yang muncul dari spermatozoa, bertanggung jawab untuk membawa pronukleus jantan dan betina bersama-sama. Bila hal ini tidak terjadi secara normal, perkembangan tidak dapat berlangsung (Scott *et al.*, 2000).

Niwa dan Sawai (2001) melaporkan dalam penelitiannya bahwa pembentukan pronukleus jantan dipengaruhi oleh tingkat hormonal eksogen, sekresi folikuler dan kekuatan ionik intraseluler dari sel telur. Pembentukan pronukleus secara positif juga berhubungan dengan konsentrasi GSH oosit pada akhir pemasakan. Pengetahuan tentang waktu pembentukan pronukleus ini bermanfaat pada berbagai penelitian manipulasi embrio. Diketuainya waktu pembentukan pronukleus ini akan memberikan kemudahan dalam pengamatan sel telur saat awal terjadinya fertilisasi.

Status inti sel telur

Hasil penelitian tentang status inti sel telur disajikan pada Tabel 2.

Metafase II

Metafase II pada kebanyakan spesies adalah suatu tahap perkembangan yang tertahan dan umumnya terjadi pada saat ovulasi terjadi (Austin dan Short, 1982). Antara dua sampai tiga jam setelah fertilisasi pada sel telur mencit, metafase pada proses meiosis diaktivasi kembali dan badan polar kedua dikeluarkan (Johnson dan Everitt, 1988). Hal itu menyebabkan penggabungan spermatozoa dan sel telur serta menstimulus benang-benang metafase pada oosit sekunder untuk melengkapi pembelahannya (Austin dan Everitt, 1982) dan segera menyelesaikan pemasakan dari metafase II ke anafase II (Rugh, 1971).

Struktur kromosom terlihat sebagai suatu struktur kumpulan bulatan-bulatan kecil. Metafase II disini ada dua macam yaitu pertama, fase pada saat inti spermatozoa berstatus kondensasi, kandungan GSH dalam oosit tidak cukup mereduksi ikatan disulfid pada inti spermatozoa maka status sel telur tetap pada fase metafase II (Gambar 1). Kedua, fase pada saat sel telur tidak dibuahi, hanya terdapat struktur kumpulan bulatan-bulatan kecil yang sejajar, tidak terdapat badan polar kedua dan kepala spermatozoa (Gambar 6). Tahap metafase II mulai terjadi pada empat jam setelah fertilisasi secara *in vivo*.

Telofase II

Pada tahap telofase II, kromatin yang terkondensasi melebar sekali lagi dan nukleoli mulai tampak (Alberts *et al.*, 1994). Secara morfologi pada fase ini struktur telofase II adalah sama dengan struktur metafase II (Gambar 2)

yaitu tergambar sebagai suatu struktur kumpulan bulatan-bulatan kecil, yang membedakannya adalah pada tahap telofase II inti spermatozoa bersatus dekondensasi.

Pre pronukleus betina

Pada saat telofase II, nukleoli mulai tampak (Alberts *et al.*, 1994). Nukleoli-nukleoli tersebut berkembang dan membengkak yang akhirnya bergabung membentuk pronukleus betina (Rothschild, 1956). Hasil lainnya juga menunjukkan bahwa ada satu fase yang status inti sel telurnya masih dalam fase pre pronukleus betina dan status inti spermatozoa sudah mulai membentuk struktur pronukleus jantan. Hal ini menunjukkan bahwa kelihatannya pronukleus jantan pembentukannya lebih dahulu terjadi daripada pronukleus betina seperti yang dilaporkan Perrealut *et al* (1987) (Gambar 5).

Pronukleus betina

Pronukleus betina ditemukan di titik pembentukannya dekat badan polar kedua ke arah pronukleus jantan sampai keduanya bertemu (Payne *et al.*, 1997). Pronukleus betina ditemukan dalam beberapa penelitian berukuran lebih kecil daripada pronukleus jantan seperti yang dilaporkan Schatten (1994), Dieguez *et al* (1995), dan Payne *et al* (1997). Struktur pronukleus betina terlihat sebagai suatu struktur bulatan kecil dekat dengan badan polar dan tidak ada bekas ekor spermatozoa di dekatnya (Gambar 4). Pronukleus betina telah dapat dimanfaatkan dalam teknologi transfer pronukleus yang berhubungan dengan penyakit-penyakit yang disebabkan kelainan atau cacat mitokodria (Hidayat, 2005).

Perkembangan sel telur setelah tahap pronukleus

Tahap perkembangan sel telur ini meliputi tahap *syngami* sampai awal terbentuknya dua sel yang selengkapnya bisa dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. *Syngami* - dua sel.

Waktu (jam)	Jumlah sel telur	Syngami (%±SD)	1 Sel (%±SD)	2 Sel (%±SD)
4	110	0	0	0
6	101	0	0	1 ± 2
8	185	0	0	0
10	112	4 ± 2	91 ± 4	2 ± 4

Langkah terakhir dalam fertilisasi adalah bergabungnya pronukleus jantan dan betina.

Pengabungan ini disebut *syngami* (Senger, 1999). Seperti yang terlihat pada Gambar 7, *syngami* dimulai dari bersatunya membran pronukleus betina dan pronukleus jantan sampai melebur menjadi inti sel. Struktur satu sel dapat terlihat pada Gambar 8. Pada gambar tersebut inti sel sudah terlihat jelas. Inti sel tersebut adalah penggabungan antara inti betina dan inti jantan yang tidak lain adalah pronukleus betina dan pronukleus jantan. Pada tahap satu sel inilah disebut zigot, setelah tahap zigot embrio memasuki tahap pembelahan mitosis (Hafez, 1993). Pada Gambar 9, diperlihatkan suatu gambaran mengenai dua sel yang mulai terjadi pembelahan. Proses pembelahan disini adalah proses terbaginya sitoplasma. Membran disekeliling bagian tengah sel terkerut ke bagian dalam sel membentuk titik pembelahan (Alberts *et al.*, 1994). Hasil penelitian menunjukkan awal pembelahan dua sel, karena hasil pembelahannya belum kompak menjadi dua sel. Setelah zigot mencapai tingkat dua sel, zigot ini menjalani serangkaian pembelahan mitosis (Langman dan Sadler, 1988).

Kejadian sel telur pada fertilisasi *in vivo*

Kejadian-kejadian ini meliputi polispermi, sel telur tidak terbuahi (*unfertil*), dan peristiwa partenogenesis yang bisa dilihat pada Tabel 4. Kejadian polispermi yaitu masuknya spermatozoa ke dalam sel telur lebih dari satu ternyata bisa terjadi pada fertilisasi *in vivo*. Menurut Yatim (1982), polispermi disebabkan oleh patologis dan fisiologis. Patologis karena konsentrasi spermatozoa terlalu tinggi dan struktur kisi-kisi pada zona pelusida sel telur kekuatannya rendah untuk menghalang spermatozoa masuk ke dalam sel telur. Fisiologis terjadi karena polispermi memang normal terjadi pada spesies tertentu seperti Mollusca, Reptil, Aves, dan Monotremata. Pada hasil yang didapat (Gambar 10), polispermi yang terjadi adalah polispermi yang bersifat patologis.

Tabel 4. Polispermi, *unfertil*, partenogenesis.

Waktu (jam)	Jumlah sel telur	Polisperm (% + SD)	Unfertil (% + SD)	Parthenogenesis (%±SD)
4	110	8 ± 6	6 ± 5	-
6	101	12 ± 11	6 ± 4	1±2
8	185	6 ± 6	2 ± 2	-
10	112	3 ± 3	0	-

Polispermi pada fertilisasi *in vivo* dapat terjadi karena lingkungan saluran reproduksi betina dapat meningkatkan kemampuan sperma tetapi tidak meningkatkan kemampuan sel telur untuk terfertilisasi dan aktivasi pertahanan terhadap polispermi. Dalam hal ini mekanisme pertahanan sel telur oleh granula kortikal dan pengerasan zona pelusida berjalan lebih lambat dibandingkan dengan kecepatan penetrasi sperma. Hal ini menyebabkan satu sel telur dapat dibuahi lebih dari satu sel sperma (Sukra *et al.*, 1989). Kortikal granula mempunyai peran penting dalam respon sel telur terhadap penetrasi sperma, yakni mencegah masuknya lebih dari satu spermatozoa ke dalam sel telur (Austin dan Short, 1982).

Apabila banyak spermatozoa yang masuk, sel telur yang menghendaki satu spermatozoa (monospermi) seperti pada mamalia pada umumnya, tetap hanya satu spermatozoa yang intinya bergabung dengan inti telur (Sagi, 1990). Hanya satu pronukleus jantan yang berperan dalam pembelahan inti (Karp dan Berril, 1981). Polispermi akan menurunkan tingkat fertilisasi karena kandungan GSH dalam sel telur menurun ketika sperma masuk ke dalam sel telur (Funahashi *et al.*, 1995).

Sel telur yang tidak dibuahi dapat diaktivasi dan berkembang menjadi individu seperti siklus hidup normal. Proses ini dikenal sebagai partenogenesis (Carlson, 1988). Aktivasi tidak harus distimulus oleh spermatozoa (Austin dan Short, 1982). Sel telur mamalia bisa diaktivasi oleh bermacam-macam perlakuan, termasuk kejutan elektronik, panas, dan dingin. Hasil dari perkembangannya biasanya adalah abnormal dan tertahan pada tahap awal perkembangan, biasanya sebelum tahap gastrula (Karp dan Berril, 1981).

Aktivasi sel telur pada prinsipnya berkisar pada faktor perubahan *physico* kimia dan perubahan *physic* dalam lingkungan telur dan karena luka di bagian korteks telur menimbulkan substansi asam yang menyebabkan kenaikan viskositas ooplasma sehingga aktivasi terjadi (Sagi, 1990), seperti yang ditemukan pada penelitian ini. Diduga atau dicurigai adanya peristiwa partenogenesis karena terjadi pada enam jam *pasca* fertilisasi dimana inti sel telur lainnya bersatus pre pronukleus. Untuk menentukan partenogenesis atau tidak, tetapi harus ada uji kromosom, dalam penelitian ini hal tersebut tidak dikerjakan.

Unfertil adalah keadaan dimana sel telur tidak terpenetrasi oleh sperma (Gambar 6). Status inti sel telur masih dalam tahap metafase II, suatu tahap perkembangan yang tertahan sebelum distimulus oleh spermatozoa (Austin dan Short, 1982). Ciri lain adalah tidak adanya badan kutub atau badan polar kedua dan bekas ekor spermatozoa. Badan kutub kedua dikeluarkan ke dalam ruang perivitelin segera setelah masuknya spermatozoa (Langman dan Sadler, 1988).

KESIMPULAN

Perubahan inti spermatozoa sampai menjadi pronukleus jantan terjadi pada delapan jam setelah fertilisasi secara alami pada mencit, pronukleus betina terbentuk setelah aktivasi sel telur oleh spermatozoa pada delapan jam setelah fertilisasi secara alami pada mencit, kejadian-kejadian pada fertilisasi *in vivo* meliputi sel telur tidak dibuahi (*unfertil*), polispermi, dan peristiwa partenogenesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of The Cell*. 3rd edition. New York: Garland Publishing, Inc.
- Austin, C.R. and R.V. Short. 1982. *Reproduction in Mammals: Book 1. Germ Cells and Fertilization*. 2nd edition. Sidney: Cambridge University.
- Birlel, S., S. Pabuccuoglu, S. Alkan, and H.I.K. Atalla. 2001. Pronuclear development of in vitro fertilized sheep oocytes. *Reproduction* 27: 8.
- 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. *Journal of Reproduction Fertility* 13: 45-75.
- Carlson, B.M. 1988. *Patten's Foundations of Embryology*. 5th edition. New York: McGraw Hill Book Company.
- Dieguez, L., C. Soler, and F. Perez-Sanchez. 1995. Morphometric characterization on normal and abnormal human zygotes. *Human Reproduction* 10: 2339-2342.
- Funahashi, H., Z. Machaty, R.S. Prather, and B.N. Day. 1995b. γ Glutamyltranspeptidase (GGT) of spermatozoa may reduce oocyte glutathione (GSH) content at sperm penetration. *Biology of Reproduction* 52 (Suppl 1): 140.
- Hafez, E. 1993. *Reproduction in Farm Animals*: 6th edition. Philadelphia: Lea and Febiger.
- Hidayat, D. 2005. *Satu Anak Dua Ibu Satu Ayah*. Koran Tempo
- Hogan, B., F. Constantini, and E. Lacy. 1986. *Manipulating The Mouse Embryo-A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Johnson, M. and B. Everitt. 1988. *Essential Reproduction*. 3rd edition. Oxford: Blackwell Scientific Publication..
- Karp, G. and N.J. Berril. 1981. *Development*. 2nd edition. New York: McGraw Hill, Inc.
- Langman and T.W. Sadler. 1988. *Embryologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Nagy, Z.P., J. Liu, H. Joris, P. Devroey, and A.V. Steirteghen. 1994. Time course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intra cytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction* 9: 1743-1748.
- Nakamura, S., Y. Terada, T. Horiuchi, C. Emuta, T. Murakami, N. Yaegashi, and K. Okamura. 2001. Human sperm aster formation and pronuclear decondensation in Bovine eggs following Intracytoplasmic Sperm Injection using a piezo-driven pipette: A novel assay for human sperm centrosomal function. *Biology of Reproduction* 65: 1359-1363.
- Niwa, K. and K. Sawai. 2001. Requirements of cysteine during in vitro maturation of pig oocytes for male pronuclear formation. *Journal of Reproduction and Development* 47: 47-54.
- Payne, D., S.P. Flaherty, and M.F. Barry, 1997. Pre eliminary observation on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction* 12: 532-541.
- Perreault, S.D., S.J. Naish, and Zirkin. 1987. The timing of hamster sperm nuclear decondensation and male pronucleus is related to sperm nuclear disulfide bond content. *Biology of Reproduction* 36: 239-244.
- Poccia, D. 1989. *The Molecular Biology of Fertilization: Reactivation and Remodelling of the Sperm Nucleus Following Fertilization*. New York: Academic Press.
- Rho, G.J., S. Kawarsky, W.H. Johnson, K. Kochhar, and K.J. Betteridge. 1998. Sperm and oocytes treatments to improve the formation of male and pronuclei and subsequent development following intarcyoplasmic sperm injection into Bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 59: 918-924.
- Rothschild, L. 1956. *Fertilization*. London: Methuen & Co. Ltd.
- Rugh, R. 1971. *A Guide to Vertebrate Development*. 6th edition. New York: Burgess Publishing Company.
- Sagi, M. 1990. *Embryologi dan Perbandingan pada Vertebrata*. Yogyakarta: Fajar Offset.
- Schatten, G. 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Developmental Biology* 165: 299-335.
- Scott, L., R. Alvero, M. Leondires, and B. Miller, 2000. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyt development and implantation. *Human Reproduction* 15: 2394-2403.
- Senger, P.L. 1999. *Pathway to Pregnancy and Parturition*. Moscow: Current Conceptions, Inc.
- Sukra, Y., L. Rahardja, dan I. Djuwita, 1989. *Embriologi I*. Bogor: PAU Ilmu Hayat IPB.
- Yatim, W. 1982. *Reproduksi dan Embryologi*. Bandung: Penerbit Tarsito.