

INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICSI) SEBAGAI TEKNIK REPRODUKSI BANTUAN UNGGULAN

INTRACYTOPLASMIC SPERM INJECTION (ICI) AS AN ADVANCED ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Takdir Saili¹, Syahrudin Said², Mohamad Agus Setiadi³, Srihadi Agungpriyono⁴,
Mozes R.Toelihere³, Arief Budiono⁴

¹Program Studi Produksi Ternak, Fak.Pertanian, Universitas Haluoleo, Kendari 93232

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Jalan Raya Bogor Km.46 Cibinong 16911

³Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

⁴Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi FKH-IPB. Kampus Darmaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Beberapa teknik fertilisasi mikro telah diterapkan untuk mengatasi masalah infertilitas pria, namun hanya *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) yang mampu meningkatkan secara nyata keberhasilan fertilisasi, implantasi dan kelahiran. Pada perkembangannya teknik ICSI juga telah diterapkan pada beberapa jenis hewan sebagai suatu model untuk mempelajari kemampuan fertilisasi berbagai jenis spermatozoa yang secara alami atau melalui fertilisasi *in vitro* tidak bisa membuahi sel telur. Walaupun keberhasilan teknik ICSI telah dapat mengatasi masalah infertilitas pada pria, teknik ICSI masih mempunyai potensi negatif yang mungkin muncul pada anak hasil ICSI. Namun demikian, hal ini perlu penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya.

Kata kunci : ICSI, infertilitas, fertilisasi *in vitro*

ABSTRACT

Since the application of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for overcoming male infertility problem, no other microfertilization techniques have been success to increase fertilization, implantation and birth rates. So far, ICSI has been applied in many species of animal as a model of study on fertilizing capacity of spermatozoa which can not fertilize the oocyte either naturally or by *in vitro* fertilization. Although the ICSI has been success to eliminate male infertility problems, it still has potential disadvantages which can occur in ICSI-produced babies. However, these potential disadvantages should be proven scientifically in the future.

Key words: ICSI, infertility, in vitro fertilization

PENDAHULUAN

Sejak keberhasilan teknik *In Vitro Fertilization* (IVF) sebagai salah satu teknik reproduksi bantuan pada manusia yang dilaporkan oleh Steptoe dan Edwards (1978), teknik ini telah memicu perkembangan teknik lain yang mendukung keberhasilan fertilisasi, seperti teknik induksi ovulasi, pengambilan sel telur, kultur oosit dan embrio, kriopreservasi embrio dan transfer embrio (TE). Demikian pula dengan teknik fertilisasi itu sendiri telah berkembang ke arah fertilisasi mikro yang ditujukan untuk mengatasi masalah gangguan reproduksi pada pasangan suami istri.

Kemajuan yang dicapai oleh teknik IVF dan TE telah banyak mengatasi persoalan infertilitas pada pria dan penyumbatan saluran tuba pada wanita dalam upaya memperoleh kehamilan dan kelahiran anak (Edwards *et al.*, 1980), namun beberapa kasus yang berhubungan dengan kegagalan fertilisasi belum dapat tertangani dengan baik. Oleh karena itu beberapa teknik fertilisasi mikro telah dikembangkan untuk mengatasi persoalan ini, antara lain *Zona Thinning* (ZT), *Zona Drilling* (ZD), *Partial Zona Dissection* (PZD), *Sub Zonal Insemination* (SUZI) dan *Intracytoplasmic Sperm Injection* (ICSI). Di antara teknik tersebut hanya ICSI yang berkembang baik dan menghasilkan perubahan yang nyata terhadap keberhasilan fertilisasi secara mikro (Palermo *et al.*, 1992). Suatu hal yang menarik adalah teknik ini awalnya dikembangkan hanya untuk membuktikan bahwa peristiwa dekondensasi spermatozoa dan pembentukan pronukleus jantan tidak terjadi sebelum spermatozoa masuk ke dalam sel telur (Hiramoto, 1966).

Dewasa ini, teknik ICSI telah banyak diaplikasikan pada manusia dengan berbagai capaian keberhasilan yang menggembirakan. Sumber spermatozoa yang digunakan dalam teknik ICSI sangat beragam bahkan spermatozoa yang immotilpun dapat digunakan untuk menghasilkan kehamilan (Okada *et al.*, 1999). Hal ini merupakan kelebihan yang dimiliki oleh teknik ICSI dibanding teknik fertilisasi bantuan yang lain.

Walaupun teknik ICSI dianggap sederhana, tetapi dalam aplikasinya melibatkan berbagai macam persoalan termasuk masalah peralatan dan kemampuan teknik operator yang pada gilirannya akan mempengaruhi tingkat keberhasilan ICSI. Teknik ICSI merupakan teknik manipulasi pembuahan secara *in vitro* yang menyalahi aturan pembuahan alami sehingga potensi hambatan fertilisasi yang dibawa oleh spermatozoa sangat besar. Hal ini disebabkan oleh hilangnya kesempatan bagi

spermatozoa untuk melangsungkan proses pendewasaan secara alamiah seperti kapasitas dan reaksi akrosom. Namun demikian, dalam perkembangannya kedua peristiwa tersebut telah dapat dilakukan secara *in vitro* sehingga spermatozoa yang diinjeksikan mampu melangsungkan proses fertilisasi.

Makalah ini akan memberikan beberapa informasi mengenai ICSI yang meliputi sejarah perkembangan manipulasi mikro dan pemanfaatan teknik ICSI khususnya pada manusia.

Sejarah Mikro Injeksi

Pada awal abad ke-20 para peneliti telah mengembangkan beberapa teknik manipulasi mikro yang secara langsung diterapkan pada sel hidup. Kite pada tahun 1911, telah berhasil memisahkan pronukleus yang baru terbentuk pada zigot menggunakan jarum mikro (Chambers, 1940). Selanjutnya Kite berpikir tentang apa yang akan terjadi jika spermatozoon diinjeksikan secara langsung ke dalam sel telur (Lillie, 1914). Pemikiran tersebut kemudian diwujudkan dengan menginjeksikan dua sampai dua belas spermatozoa starfish ke sebuah sel telur ikan yang sama, namun tak satupun sel telur terbuahi.

Beberapa alat yang menunjang kerja manipulasi mikro telah berhasil dibuat antara lain *joy stick* oleh Emmerson pada tahun 1928 yang dapat mengatur secara langsung pergerakan alat manipulasi mikro sesuai keinginan operator (El Badry, 1963). Alat ini selanjutnya dikembangkan oleh De Fonbrune pada tahun 1928 menggunakan prinsip hidrolis. Selain itu de Fonbrune (1934) juga menciptakan alat *microforge* yang masih tetap dipergunakan oleh banyak peneliti hingga sekarang. Teknik manipulasi mikro telah berkembang secara bertahap lebih dari satu abad dan sudah mencapai tingkat keberhasilan hingga para peneliti telah mampu memotong sebuah kromosom tunggal.

ICSI sebagai suatu teknik yang memungkinkan seseorang untuk memasukkan spermatozoon ke dalam sel telur untuk tujuan fertilisasi dengan bantuan alat mikromanipulator telah mampu meningkatkan angka fertilisasi spermatozoa yang berasal dari pria infertil. Kelebihan utama teknik ini adalah dapat menggunakan spermatozoa tanpa mempertimbangkan motilitasnya yang merupakan syarat mutlak pada IVF (Okada *et al.*, 1999; Kuramoto *et al.*, 1997). Beberapa jenis hewan telah lahir dari hasil ICSI yang menggunakan spermatozoa immotil (Yanagimachi, 2001). Satu hal yang perlu dicatat bahwa ICSI dalam aplikasinya telah berkembang dengan

berbagai teknik yang berbeda untuk menghasilkan pembuahan normal.

Penelitian-penelitian selanjutnya selain melaporkan keberhasilan ICSI dalam mendukung pembentukan pronukleus dan perkembangan embrio hingga tahap blastosis, juga melaporkan keberhasilan ICSI pada hewan dalam menghasilkan anak. Beberapa kelahiran anak hewan hasil ICSI telah dilaporkan pada kelinci (Hosoi *et al.*, 1988 dan Iritani, 1989), mencit (Kimura and Yanagimachi, 1995), kucing (Pope *et al.*, 1998), kuda (Cochran *et al.*, 1998), domba (Gomez *et al.*, 1998), sapi (Hamano *et al.*, 1999), kera (Hewitson *et al.*, 1999), babi (Martin, 2000) dan tikus (Said *et al.*, 2003). Penerapan ICSI secara langsung pada manusia dilakukan pertama kali oleh Lanzendorf *et al.*, (1988), namun hasilnya hanya mencapai pembentukan pronukleus jantan dan betina. Keberhasilan monumental penerapan teknik ICSI pada manusia diawali oleh Palermo *et al.*, (1992) dimana embrio hasil ICSI telah mampu berkembang setelah transfer hingga tahap kehamilan.

Penerapan Teknik ICSI pada Manusia

Palermo *et al.*, (1992) memberikan komentar bahwa setelah belasan tahun mengerjakan IVF dan gamet pada manusia, tidak ada teknik yang lebih memuaskannya selain dari ICSI. Teknik tersebut dengan nyata mampu memecahkan persoalan dalam membantu pembuahan, khususnya yang berhubungan dengan masalah ketidaksuburan pada pria.

Berdasarkan penelitian Patrizio dan Broomfield (1999) didapatkan sekitar 30-40% kasus ketidaksuburan pada pasangan suami istri disebabkan oleh ketidaksuburan pada pria. Selanjutnya dijelaskan bahwa secara umum ketidaksuburan pria dapat disebabkan karena kelainan pada spermatozoa seperti *azoospermia* (gagalnya proses spermatogenesis yang menyebabkan tidak adanya spermatozoa dalam semen), *oligozoospermia* (subnormal konsentrasi spermatozoa yang diejakulasikan), *asthenozoospermia* (hilangnya atau terjadi penurunan motilitas spermatozoa), *teratozoospermia* (suatu kondisi dimana terdapat spermatozoa dengan bentuk tidak normal dalam semen) atau karena kombinasi diantaranya..

Cohen *et al.*, (1994) mengemukakan bahwa pasangan yang gagal memperoleh pembuahan setelah IVF, maka peluang terjadinya pembuahan jika IVF dilakukan untuk kedua kalinya kurang dari 25%. Pada penelitian yang lain, Palermo *et al.*, (1993) melaporkan tingkat kehamilan yang tinggi (40%) ketika melakukan

ICSI pada 38 pasangan yang telah gagal total dengan IVF. Hasil ini memperlihatkan bahwa ICSI mampu menolong pasien yang telah gagal dengan IVF.

Melalui ICSI, pembuahan lebih efisien dan tepat karena hanya memerlukan satu spermatozoa untuk membuahi sel telur. Bahkan ICSI pada beberapa jenis hewan seperti mencit tidak mempertimbangkan motilitas dan viabilitas spermatozoa (Wakayama and Yanagimachi, 1998). Oleh karena itu, Silber *et al.*, (1994) mengemukakan bahwa selama dimungkinkan untuk mengambil spermatozoa dari epididimis atau testis dengan pembedahan mikro, maka ICSI menjadi teknik pilihan yang tepat untuk menangani kasus *azoospermia*. Selanjutnya dikatakan bahwa dengan kombinasi teknik *Microsurgical epididymal sperm aspiration* (MESA) dan ICSI dapat diperoleh pembuahan dan kehamilan yang tinggi. Akan tetapi teknik ini penanganannya memakan waktu cukup lama dan juga memerlukan kemampuan khusus, membutuhkan anestesi total, dan dari beberapa kasus menimbulkan trauma setelah operasi. Karena alasan inilah Craft *et al.*, (1995) memperkenalkan cara lain yaitu teknik *percutaneous epididymal sperm aspiration* (PESA). PESA adalah teknik pengambilan spermatozoa epididimis dengan cara memasukkan jarum berukuran sangat kecil langsung ke kepala epididimis. Dibandingkan dengan MESA, teknik ini sangat sederhana dan dapat dikerjakan dengan anestesi lokal dan waktu yang digunakan relatif singkat (sekitar 10-20 menit).

Pelaksanaan ICSI

Pasien ICSI umumnya adalah pasangan suami isteri yang telah diperiksa kondisi reproduksinya dan dipastikan bahwa suami tidak dapat menghasilkan spermatozoa yang memenuhi syarat untuk melakukan fertilisasi baik secara alami maupun melalui fertilisasi *in vitro*. Untuk mendapatkan jumlah sel telur yang memenuhi syarat kualitas dan kuantitas untuk tujuan ICSI maka istri diberi perlakuan induksi hormon. Mansour *et al.*, (1994) mengemukakan bahwa pengambilan sel telur paling baik dilakukan 36 jam setelah injeksi hormon *human chorionic gonadotrophin* (hCG). Hal ini dimaksudkan agar sel telur yang diambil sudah cukup matang sehingga siap dibuahi oleh spermatozoa. Sebelum ICSI dilakukan kumulus sel telur dibebaskan dengan menginkubasi sel telur beberapa saat di dalam medium penyangga HEPES yang mengandung 80mIU/ml hyaluronidase. Sel telur selanjutnya dipindahkan ke medium kultur dan diinkubasi sambil menunggu saat manipulasi. Hanya sel telur yang mempunyai polar bodi pertama (PB-I) yang dipilih untuk ICSI. Selanjutnya

dilakukan seleksi terhadap spermatozoa yang akan digunakan melalui berbagai macam metode seleksi, seperti *swim up* atau *side migration* (Bourne *et al.*, 1995).

Selain melakukan seleksi spermatozoa sebelum penerapan ICSI juga dilakukan immobilisasi atau menghentikan pergerakan spermatozoa. Hal ini dilakukan agar mudah memasukkan atau mengambil spermatozoa ke dalam pipet injeksi dan spermatozoa yang telah terambil tidak melakukan pergerakan lebih lanjut dalam pipet injeksi. Selain itu immobilisasi juga dapat mendukung terjadinya proses dekondensasi spermatozoa (Boediono, 2001). Mengimmobilisasi spermatozoa umumnya dilakukan dengan menekan ekor spermatozoa sampai ke dasar petri (Dozortzev *et al.*, 1995) atau dengan memisahkan kepala dan ekor dengan cara sonikasi (Kuretake *et al.*, 1996). Selanjutnya, ICSI dilakukan dengan cara memasukkan satu spermatozoa ke dalam sel telur secara mekanik dengan menggunakan alat mikromanipulator di bawah mikroskop *inverted*.

Salah satu masalah serius pada injeksi spermatozoa khususnya pada manusia adalah menyeleksi spermatozoa normal untuk manipulasi. Van Steirteghem *et al.*, (1993) telah mengidentifikasi spermatozoa hidup dalam semen dengan menyeleksi spermatozoa menggunakan metode *percoll density* dan menambahkan *2-deoxyadenosin* (2DA) dan *pentoxifylline* untuk merangsang motilitas spermatozoa. Lebih lanjut dikatakan bahwa kemungkinan 2DA bersifat toksik terhadap embrio yang dapat mengakibatkan penahanan pada pembelahan dan perkembangan embrio selanjutnya. Akan tetapi, Nagy *et al.*, (1995) mengemukakan bahwa peningkatan jumlah spermatozoa yang abnormal dalam semen bukan merupakan faktor kritis yang menurunkan tingkat fertilisasi setelah ICSI. Selain itu, Saili dan Said (2005) melaporkan bahwa spermatozoa yang nyata telah mati pun karena perlakuan pembekuan tanpa krioprotektan dan perlakuan pemisahan kepala spermatozoa dengan ekor masih mampu mendukung pembentukan pronukleus jantan dan betina setelah diinjeksikan ke dalam sel telur tikus. Hal ini merupakan bukti tambahan bahwa untuk tujuan fertilisasi melalui teknik ICSI, spermatozoa yang digunakan tidak perlu motil dan utuh.

Resiko Penggunaan Teknik ICSI

Pada kenyataannya ICSI melibatkan suatu mekanisme interaksi spermatozoa dan sel telur yang sangat berbeda dengan pembuahan secara alami. Memasukkan spermatozoa langsung ke dalam sel telur,

bukan hanya fungsi sel kumulus dan zona pellusida yang terabaikan tetapi juga oolemma, dimana secara alami merupakan komponen yang berperan sebagai penyeleksi dan pendewasa spermatozoa sebelum sel telur dan spermatozoa bersatu. Kenyataan inilah yang memungkinkan ICSI memiliki potensi resiko yang tidak kecil dan menjadi topik perdebatan serius hingga saat ini. Beberapa hal penting yang menjadi perdebatan adalah: pertama, karena spermatozoa dimasukkan langsung ke dalam sel telur tanpa melalui proses seleksi secara alami, maka besar kemungkinan spermatozoa yang dimasukkan adalah spermatozoa rusak atau spermatozoa yang abnormal (Mansour, 1998). Cummins dan Jequier (1994) telah memperingatkan bahwa terdapat kerusakan genetik yang tidak jelas pada beberapa kasus faktor ketidaksuburan pria dan konsekuensi resiko penggunaan teknik mikro untuk membantu pembuahan; kedua, terdapat kemungkinan memasukkan material asing yang tidak diketahui ke dalam sitoplasma selama injeksi, misalnya polyvinyl pyrrolidone (PVP), minyak, kontaminasi percoll dan lain-lain. Resiko yang lebih parah lagi bahwa kepala spermatozoa mampu mengikat DNA asing (Maione *et al.*, 1998). Pengikatan ini semakin besar peluangnya karena spermatozoa sebelum diinjeksi ke dalam sel telur diimmobilisasi terlebih dahulu yang mengakibatkan rusaknya membran plasma spermatozoa, dimana diketahui bahwa pada daerah tersebut terdapat faktor penghambat interaksi antara DNA asing dengan spermatozoa; ketiga, adanya kemungkinan rusaknya *meiotic spindle* pada sel telur pada saat injeksi; keempat, terjadinya luka pada spermatozoa akibat immobilisasi sebelum injeksi merupakan salah satu faktor rusaknya DNA spermatozoa. Hal ini terjadi karena terdapat perbedaan lingkungan di dalam spermatozoa yang mengandung Na^+ rendah dan K^+ tinggi sedangkan lingkungan di luar sel saat manipulasi mengandung Na^+ tinggi dan K^+ yang rendah. Perbedaan inilah menurut Martin *et al.*, (1988) dan Rybouchkin *et al.*, (1996) akan mengakibatkan kerusakan kromosom. Namun demikian, semua potensi negatif yang mungkin muncul sebagai keterbatasan teknik ICSI masih membutuhkan penelitian lebih lanjut untuk membuktikannya. Beberapa peneliti melaporkan bahwa kejadian *congenital malformation* pada bayi yang lahir melalui ICSI berkisar 2.3-2.6% (Coulam *et al.*, 1996; Palermo *et al.*, 1996; Bonduelle *et al.*, 1997; Bourne *et al.*, 1997; Wisanto *et al.*, 1997), sedangkan yang lahir melalui IVF dan lahir melalui perkawinan secara alami rata-rata 2.2% (Tarlantzis, 1997).

Sejauh ini, teknik ICSI baik menggunakan spermatozoa ejakulat, spermatozoa epididimis atau testis

telah mampu memberikan tingkat pembuahan dan keberhasilan kelahiran. Kelainan infertilitas pada pria seperti azoospermia atau infertil secara immunologi, maupun infertil yang tidak bisa dijelaskan yang sebelumnya gagal dengan teknik IVF konvensional, dengan teknik ICSI mampu memberikan hasil fertilitas yang memuaskan.

DAFTAR PUSTAKA

- Boediono, A., 2001. Sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and oocyte activation improve early development of microfertilized goat oocytes. *Reprotech*. 1:29-34.
- Bonduelle, M., Wilkens, A., Buysee, A., van Assche, E., Wisanto, A., Devroey, P., van Steirteghem, A.C., and Liebaers, I., 1997. Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with ejaculated, epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum.Reprod.* (Suppl.4) 11:131-155.
- Bourne, H., Stern, K., Clarke, G., Pertile, M., Speirs, A., and Baker, H.W., 1997. Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa with 47, XXY Klinefelter's syndrome. *Hum.Reprod.* 12:2447-2450.
- Bourne, H., Riching, N., Liu, D.Y., Clarke, G.N., Harari, O., and Baker, H.W.G., 1995. Sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection: methods and relationship to fertilization results. *Reprod.Fertil.Dev.* 7:177-183.
- Chambers, R., 1940. The micromanipulation of living cells. The Cells and Protoplasm. *Am. Assoc.Adv. Sci.* 40:20-30.
- Cochran, R., Meintjes, M., Roggio, B., and Hylan, D., 1998. Live foals produced from sperm injected oocytes derived from pregnant mares. *J.Equine.Vet. Sci.* 18:736-740.
- Cohen, J., Aikani, M., Munne, S., and Palermo, G.D., 1994. Micromanipulation in clinical management of fertility disorders. *Reprod.Endoc.* 12:151-168.
- Coulam, C.B., Opashl, M.S., Sherins, R.J., Thorsell, L.P., Dorfmann, A., Krysa, L., Fugger, E., and Schulman, J.D., 1996. Comparisons of pregnancy loss patterns after intracytoplasmic sperm injection and other assisted reproductive technologies. *Fertil.Steril.* 65:1157-1162.
- Craft, I., Tsirigotis, M., Bennet, V., Taranissi, M., Khalifa, Y., Hogewind, G., and Nicholson, N., 1995. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil.Steril.* 63:1038-1042.
- Cummins, J.M., and Jequier, A.M., 1994. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. *Hum.Reprod.* 9:1214-1219.
- De Fonbrune P., 1934. Demonstration d'un micromanipulator pneumatique et d'un appareil pour la fabrication des microinstrument. *Ann.Physiol.Physiochem.* 10:4.
- Dozortzev, D., Rybouchkin, A., Sutter, P., Qian, C., and Dhont, M., 1995. Human oocyte activation following intracytoplasmic sperm injection: the role of the sperm cell. *Hum. Reprod.* 10:403-407.
- Edwards, R.G., Steptoe, P.C., and Purdy J.M., 1980. Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 87:737-756.
- El Badry H. 1963. Micromanipulators and Micromanipulation. Academic Press, New York.
- Gomez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., and Maxwell, W.M.C., 1998. Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and *in vitro* fertilization. *Theriogenology.* 49:1143-1154.
- Hamano, K., Li, X., Qian, X.Q., Funachi, F., Furudate, M., and Minato, Y., 1999. Gender preselection in cattle with intracytoplasmically injected, flow cytometrically sorted sperm heads. *Biol. Reprod.* 60:1194-1197.
- Hewitson, L.C., Dominiko, T., Takahashi, D., Martinovich, C., Ramalho-Santos, J., Sutovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monteith, D., Neuringer, M., Battaglia, D., Simerly, C., and Schatten, G., 1999. Unique checkpoints during the first cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkey. *Nat.Med.* 5:431-433.

- Hiramoto, Y., 1966. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp.Cell.Res.* 27:416-426.
- Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., and Iritani, A., 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. In: *Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Abst.Pp.331.
- Iritani, A., 1989. Micromanipulation of oocytes and embryos. In: *Proceedings of 13rd World Congress on Fertility and Sterility*, Marrakech, Morocco, Oct.1-5, 1989. Parthenon Publishing, Karnforth, UK.
- Kimura, Y., and Yanagimachi, R., 1995. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* 52:709-720.
- Kuramoto, T., Boediono, A., Sugioka, M., Umebayashi, T., Fukuda, K., Motoishi, M., and Komatsu, K., 1997. Pregnancies from obstructive azoospermia patients after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa. In: *Proceedings of 10th World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, Vancouver Canada 24-28 May 1997. Pp.523-525.
- Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K., and Yanagimachi, R., 1996. Fertilization and development of mouse oocytes injected with isolated sperm heads. *Biol.Reprod.* 55:789-795.
- Lanzendorf, S.E., Maloney, M.K., Veeck, L.L., Slusser, J., Hodgen, G.D., and Rosenwaks, Z., 1988. A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil.Steril.* 49:835-842.
- Lillie, F.R., 1914. Studies of fertilization. IV. The mechanism of fertilization in *Arbacia*. *J.Exp.Zool.* 16:523-590.
- Maione, B., Lavitrano, M., Spadafora, C., and Kiessling, A.A., 1998. Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol.Reprod.Dev.* 50:406-409.
- Mansour, R., 1998. Intracytoplasmic sperm injection: a state of the art technique. *Hum.Reprod.* 4:43-56.
- Mansour, R., Aboulghar, M.A., and Serour, G.I., 1994. Study of the optimum time for human chorionic gonadotropin-ovum pick-up interval in *in vitro* fertilization. *J.Ass.Reprod.Gen.* 11:428-481.
- Martin, M.J., 2000. Development of *in vivo* matured porcine oocytes following intracytoplasmic sperm injection. *Biol.Reprod.* 63:109-112.
- Martin, R.H., Ko, E., and Rademaker, A., 1988. Human sperm chromosome complements after microinjection of hamster eggs. *J.Reprod.Fertil.* 84:179-186.
- Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Verheyen, G., Tournaye, H., Camus, M., Derde, M.C., Devroey, P., and van Steirteghem, A.C., 1995. The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum.Reprod.* 10:1123-1129.
- Okada, H., Fujioka, H., Tatsumi, N., and Fujisawa, M., 1999. Assisted reproduction for infertile patients with immotile spermatozoa associated with autosomal dominant polycystic kidney disease. *Hum.Reprod.* 14:110-113.
- Palermo, G.D., Cohen, J., and Rosenwaks, Z., 1996. Intracytoplasmic sperm injection: a powerful tool to overcome fertilization failure. *Fertil.Steril.* 65:889-908.
- Palermo, G.D., Joris, H., Derde, M.P., Camus, M., Devroey, P., and van Steirteghem, A.C., 1993. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil.Steril.* 59:826-835.
- Palermo, G.D., Joris, H., Devroey, P., and van Steirteghem, A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 340:17-18.
- Patrizio, P., and Broomfield, D., 1999. The genetic basis of male infertility. In: *Male fertility and infertility*. Glover, T.D., and Barratt, C.L.R., (eds). Cambridge University Press, UK. Pp:162-179

- Pope, C.E., Johnson , C.A., McRae, M.A., Keller, G.L., and Dresser, B.L., 1998. Development of embryos produced by intracytoplasmic sperm injection of domestic cat oocytes. *Anim.Reprod.Sci.* 53:221-236.
- Rybouchkin, A.V., de Sutter, P., and Dhont, M., 1996. Unprotected freezing of human spermatozoa axerts a detrimental effect on their oocyte activating capacity and chromosome integrity. *Zygote.* 4:263-268.
- Said, S., Saili, T., dan Tappa, B., 2003. Pengaktifan dan pembuahan sel telur tikus setelah disuntik dengan kepala spermatozoa. *Hayati.* 10:96-99.
- Saili, T., and Said, S., 2005. The ability of rat cauda epididymal spermatozoa cryopreserved in liquid nitrogen without cryoprotectants to induce pronuclear formation. *J.Vet* (Submitted).
- Silber, S.J., Nagy, Z.P., and Liu, J., 1994. Conventional *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum.Reprod.* 9:1705-1709.
- Stephoe, P.C., and Edwards, R.G., 1978. Birth after the re-implantation of a human embryo. *Lancet.* ii:366.
- Tarlatzis, B., 1997. Sons of manipulated oocytes. *Congress on Human Oocytes: From Physiology to IVF*, Bologna, Italy. Abstr.Pp.50.
- Van Steirteghem, A.C., Nagy, Z.P., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wisanto, A., and Devroey, P., 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* 8:1061-1066.
- Wakayama, T., and Yanagimachi, R., 1998. Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat.Biotech.* 16:639-641.
- Wisanto, A., Bonduelle, M., Camus, M., Tournaye, H., Magnus, M., Liebaers, I., van Steirteghem, A.C., Devroey, P., 1997. Obstetric outcome of 904 pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.* (Suppl.4) 11:121-129.
- Yanagimachi, R., 2001. Gamete manipulation for development: new methods for conception. *Reprod. Fertil. Dev.* 13:3-14.