

# **Perkembangan Praimplantasi Embrio Mencit dengan Materi Genetik yang Berasal dari Parental, Maternal, dan Inti Sel Somatik**

*(PRE-IMPLANTATION DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYO WITH GENETIC MATERIAL DERIVED FROM PARENTAL, MATERNAL AND SOMATIC CELL NUCLEUS)*

**Harry Murti<sup>1,2</sup>, Mokhammad Fahrudin<sup>3</sup>, Mohamad Agus Setiadi<sup>4</sup>,  
Boenjamin Setiawan<sup>1</sup>, Arief Boediono<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Divisi Stem Cell, Stem Cell and Cancer Institute,  
Jl. Jend. Ahmad Yani No.2 Pulo Mas, Jakarta 13210.  
Telp. (+62-21) 47860173. Email: harry.murti@kalbe.co.id

<sup>2</sup>Program Studi Biologi Reproduksi, Sekolah Pascasarjana,

<sup>3</sup>Laboratorium Embriologi,

Departemen Anatomi, Fisiologi, dan Farmakologi,

<sup>4</sup>Bagian Reproduksi dan Kebidanan,

Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680.

## **ABSTRAK**

Embrio kloning dan embrio partenogenetik merupakan sumber sel punca yang potensial untuk pengobatan regeneratif. Sel punca yang berasal dari embrio tersebut diharapkan dapat mengatasi hambatan masalah etika penggunaan embrio fertilisasi untuk tujuan terapi. Perkembangan pra-implantasi menjadi tahapan yang penting hingga embrio berkembang mencapai tahap blastosis. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memproduksi embrio kloning, embrio partenogenetik, dan embrio fertilisasi *in vivo* mencit serta mempelajari tahapan perkembangan pra-implantasi pada kultur *in vitro*. Penelitian ini menggunakan embrio fertilisasi *in vivo*, sel oosit, dan sel kumulus mencit. Perlakuan superovulasi dilakukan pada mencit betina dengan penyuntikan hormon *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG) dan *human chorionic gonadotropin* (hCG). Embrio fertilisasi tahap dua sel dikoleksi pada hari kedua setelah penyuntikan hCG. Embrio kloning dihasilkan dari aplikasi Transfer Inti Sel Somatis (TISS) yang meliputi enukleasi, transfer inti, dan aktivasi buatan. Embrio partenogenetik dihasilkan dengan teknik aktivasi buatan. Hasil menunjukkan bahwa aplikasi TISS dapat menghasilkan embrio kloning yang mampu berkembang hingga mencapai tahap blastosis (3,2%). Embrio partenogenetik yang dihasilkan oleh aktivasi buatan dapat berkembang hingga tahap blastosis (8,6%). Tingkat efisiensi embrio partenogenetik yang mampu mencapai tahap blastosis lebih tinggi dari pada embrio kloning. Embrio fertilisasi menunjukkan perkembangan yang lebih baik dan efisien dibandingkan dengan embrio kloning dan embrio partenogenetik pada kultur *in vitro*.

Kata-kata kunci : embrio, fertilisasi, kloning, partenogenetik, kultur *in vitro*

## **ABSTRACT**

Cloned embryo and parthenogenetic embryo are a potential source of stem cells for regenerative medicine. Stem cells derived from those embryos are expected to overcome the ethical issues to the use of fertilization embryos for therapeutic purposes. The pre-implantation development is a critical step for developing embryos reach the blastocyst stage. The objectives *in vivo* of this research are to produce mouse cloned embryo, parthenogenetic embryo, and fertilized embryo and to study stages of *in vitro* pre-implantation development culture. *In vivo* fertilized embryos, mouse oocytes, and cumulus cells were used in this study. Treatment was performed on female mice superovulated with PMSG and hCG injections. Two-cell stage of *in vivo* fertilized embryos were collected on the second day post hCG injection. Cloned embryos were produced through Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT), which included enucleation, nuclear transfer and artificial activation. Parthenogenetic embryos were produced with artificial activation technique. The result of the research indicated that SCNT application was able to produce cloned embryos

which could develop to blastocyst stage (3,2%). In addition, artificial activation of oocytes could produce parthenogenetic embryos which were able to develop up to the blastocyst stage (8,6%). In conclusion, efficiency level of parthenogenetic embryos that is able to reach the blastocyst stage was higher than in the cloned embryos. Fertilized embryos shows a better development and more efficient compared to *in vitro* cloned embryos and parthenogenetic embryos cultures.

Keywords : embryo, fertilization, cloned, parthenogenetic, *in vitro* culture

## PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi Transfer Inti Sel Somatik (TISS) / *Somatic Cell Nuclear Transfer* (SCNT) telah menjadi kecendrungan baru dalam kemajuan embriologi dan biomedis (McLaren 2000). Teknik TISS menjadi sangat populer setelah terungkap dari beberapa hasil studi yang meneliti tentang potensi pemanfaatan teknik transfer inti untuk memproduksi *nuclear transfer Embryonic Stem Cell* (ntESC) dan pemanfaatannya untuk terapi penyakit degeneratif (Hochedlinger dan Jaenisch, 2003). Teknik TISS pada dasarnya meliputi enukleasi (pengeluaran inti sel oosit resipien), transfer inti (inti sel somatik dimasukkan ke dalam sitoplasma sel oosit resipien), dan aktivasi (menginduksi sel oosit hasil rekonstruksi untuk mengalami *nuclear reprogramming* dan berkembang seperti sel embrio yang normal) (Colman 2000).

Aplikasi TISS untuk memproduksi ntESC memberi harapan baru dalam pengembangan *therapeutic cloning* sebagai alternatif pengobatan berbagai penyakit degeneratif. Secara teoritis ntESC memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan sel punca (*stem cell*) dari sumber yang lain. Transplantasi ntESC yang bersifat *autologous* diharapkan mampu mengatasi masalah penolakan sistem imun pada penderita (Cibelli *et al.*, 2001). Ketidakcocokan karakter *Human Lymphocyte Antigen* (HLA), antara sel donor dengan sel pasien menyebabkan sel donor dianggap sebagai substansi asing yang dapat menimbulkan reaksi penolakan yang dikenal dengan *Graft Versus Host Diseases/GvHD* (Wobus dan Boheler 2005). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya telah dilaporkan bahwa ESC dapat diarahkan menjadi sel-sel neuron (Wakayama *et al.*, 2001), ginjal (Hipp dan Atala, 2004), otot jantung (Kodifis *et al.*, 2004), dan pankreas (Paek *et al.*, 2005).

Salah satu kendala pada aplikasi TISS baik untuk memproduksi ntESC maupun hewan kloning adalah rendahnya tingkat efisiensi perkembangan embrio hasil SCNT hingga tahap blastosis dan keberhasilan kultur sel lestari ntESC (Gurdon *et al.*, 2003). Penelitian

sebelumnya menunjukkan adanya indikasi bahwa penyebab rendahnya efisiensi pada sel embrio hasil kloning adalah proses *nuclear reprogramming* belum diketahui secara sempurna, sehingga inti sel belum sepenuhnya dapat berubah pola ekspresi genetiknya menjadi seperti pola perkembangan embrionik (Hochedlinger dan Jaenisch, 2003). Berbagai pengembangan teknik TISS telah dilakukan, namun hingga saat ini belum diperoleh hasil yang memuaskan. Selain itu aplikasi TISS pada manusia masih menjadi perdebatan dalam masalah etika, sehingga pengembangan teknik ini lebih banyak dikaji pada hewan coba (Murti *et al.*, 2008).

Tahapan penting pada aplikasi TISS adalah pada saat terjadi *nuclear reprogramming*. Inti sel somatis yang telah ditransfer ke dalam sitoplasma sel oosit akan mengalami perubahan baik secara morfologi maupun molekuler (Choi *et al.*, 2004). Beberapa hipotesis menyatakan bahwa perlakuan aktivasi pada sel oosit pasca transfer inti merupakan awal dari proses *nuclear reprogramming* (Loi *et al.*, 2003). Aktivasi pada sel oosit tahap Metafase II (MII) merupakan modifikasi dari proses fertilisasi secara alami. Osilasi ion  $Ca^{2+}$  intraseluler mutlak diperlukan untuk menginduksi proses aktivasi (Vincent *et al.*, 1992).

Pada transfer inti dengan resipien pada tahap MII, konsentrasi *Maturation Promoting Factor* (MPF) yang tinggi dapat menyebabkan inti donor mengalami *Nuclear Envelope Breakdown* (NEBD) dan *Premature Chromosome Condensation/PCC* (Wakayama dan Yanagimachi, 2001). Secara molekuler, akan terjadi hipermetilasi DNA dan deasetilasi histon. Asetilasi histon juga berperan dalam modifikasi epigenetik karena dapat memengaruhi metilasi DNA dan ekspresi protein (Enright *et al.*, 2003). Keberhasilan *nuclear reprogramming* sangat menentukan pola ekspresi genetik selama proses perkembangan dan pertumbuhan sel embrio kloning (Piedrahita *et al.*, 2004).

Aktivasi buatan juga sering digunakan untuk menghasilkan embrio partenogenetik.

Perbedaan antara sel embrio partenogenetik dengan sel embrio kloning adalah pada inti sel yang diaktivasi. Pada embrio partenogenetik, materi genetik hanya berasal dari maternal tanpa ada unsur paternal, sedangkan materi genetik pada embrio kloning berasal dari inti sel somatik tanpa unsur genetik dari maternal. Oleh karena itu embrio partenogenetik hanya memiliki satu set *Major Histocompatibility Complex* (MHC) sehingga berpotensi menjadi donor yang universal (Lin *et al.*, 2003). Apabila diimplantasikan ke uterus, embrio partenogenetik tidak dapat bertahan hingga kelahiran, sehingga tidak bisa digunakan untuk menghasilkan individu baru (Boediono *et al.*, 1995). Dalam penelitian ini metode aktivasi yang digunakan sama, baik untuk memproduksi sel embrio kloning maupun sel embrio partenogenetik. Tujuan penelitian ini adalah memproduksi sel embrio kloning, embrio fertilisasi *in vivo* dan embrio partenogenetik serta mempelajari tahapan perkembangannya pada kultur *in vitro*.

## METODE PENELITIAN

### Produksi Embrio Kloning

**Donor Inti Sel.** Isolasi sel kumulus dilakukan menurut Kishigami *et al.*, (2006) dan Wakayama *et al.*, (1998). Sel-sel kumulus dipisahkan dengan penambahan hyaluronidase 0,1% (Sigma, H4272, St. Louis, MO, USA) dalam medium M2 (Specialty media, MR-015P-D, Phillipsburg, New Jersey, USA). Perlakuan tersebut dilakukan selama 10 menit. Lalu 2  $\mu$ L dari suspensi sel-sel kumulus dipindahkan ke dalam 10  $\mu$ L Chatot-Ziamek Bavister (CZB) - tanpa glukosa yang mengandung *polyvinylpyrrolidone* (PVP) ( $M_r$  360 x 10<sup>3</sup>; Sigma, PVP360, St. Louis, MO, USA) 10% (w/v). Sel kumulus yang dipilih sebagai donor untuk transfer inti adalah yang berukuran 5-7 mm. Sel-sel kumulus dikultur dalam CZB – PVP pada suhu 37°C dengan kadar CO<sub>2</sub> 5% selama minimal satu jam sebelum perlakuan lebih lanjut.

**Resipien Sel.** Superovulasi dilakukan menurut Kishigami *et al.*, (2006). Sel-sel oosit diisolasi dari mencit betina galur DDy yang berumur 8-12 minggu. Mencit betina distimulasi untuk mengalami superovulasi dengan menyuntikan hormon *Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin*/PMSG (Intervet International BV, Folligon, Boxmeer, Holland)

7,5 IU dan *human Chorionic Gonadotrophin*/hCG (Intervet International BV, Chorulon, Boxmeer, Holland) 7,5 IU menggunakan *syringe* (Terumo, SS+01T2613, Philippines) 1mL dengan interval waktu 46-48 jam. Enam belas jam setelah penyuntikan hCG, *Cumulus Oocyte Complexes* (COC) diisolasi dari *oviduct* dengan menggunakan mikroskop stereo (Nikon, SMZ-2T, Japan). Setelah diisolasi dari sel kumulus, sel oosit dikultur dalam medium CZB tanpa glukosa yang mengandung *Bovine Serum Albumin* (BSA) (Sigma, A3311, St. Louis, MO, USA) 1mg/mL, ditutup dengan *mineral oil* (Sigma, M8410, St. Lois, MO, USA) dan disimpan dalam suhu 37°C dan kadar CO<sub>2</sub> 5% di dalam inkubator (Sanyo, MCO-95, Japan).

### Manipulasi Embrio Mencit

**Pembuatan Pipet Mikromanipulasi Injeksi dan Holding.** Bahan pipet mikromanipulasi adalah tabung borosilikat gelas kapiler tanpa filamen (Sutter Instrument, B100-75-10). Pipet mikromanipulasi injeksi dibuat dengan menggunakan alat *micro-puller* (Sutter Instrument, P-87) dan *micro-forge* (Narishige, MF-79, Japan). Ujung pipet mikromanipulasi injeksi berdiameter bagian luar ~ 15 $\mu$ m untuk enukleasi dan 5-6 $\mu$ m untuk transfer inti. *Mercury* (Madespa MA, 0561, Spain) dimasukkan ke dalam pipet mikromanipulasi injeksi melalui bagian belakang menggunakan *syringe* (Terumo, SS+01T2613, Philippines) 1 mL. Ujung pipet mikromanipulasi *holding* berdiameter bagian luar 80-100  $\mu$ m dan berdiameter dalam 20-30  $\mu$ m (Kishigami *et al.*, 2006).

**Enukleasi Kromosom MII dari Sel Oosit.** Enukleasi dilakukan menurut Kishigami *et al.*, (2006) dan Wakayama *et al.*, (2001). Kumpulan sel-sel oosit (biasanya berjumlah 20) dipindahkan ke dalam *drop* medium M2 ( $\pm$  10  $\mu$ L) yang mengandung cytochalasin B (Sigma, C6762, St. Louis, MO, USA) 5  $\mu$ L/mL. Tutup cawan petri 35mm (Nunc, 153066, Roskilde, Denmark) digunakan sebagai tempat membuat *drop* medium untuk mikromanipulasi. Mikroskop *inverted* (Olympus, IX70, Japan) dengan *Thermoplate* (Tokai Hit, MATS-U55R30, Japan) dan satu perangkat *micromanipulator* (Narishige, Japan) digunakan untuk melakukan manipulasi sel oosit. Sel oosit diposisikan tidak bergerak dengan ditahan menggunakan pipet *holding*. Zona pelusida sel oosit lalu ditembus dengan menggunakan *Piezo* (Prime Tech, PMAS-

CT150, Japan) yang menggetarkan ujung pipet mikromanipulasi injeksi yang digunakan untuk enukleasi (dengan diameter bagian dalam  $\pm 15 \mu\text{m}$ ). Komplek benang spindel kromosom MII, dapat ditandai sebagai *spot* yang dapat ditembus cahaya di dalam ooplasma dengan perbesaran 20x Optik *Hoffman Modulation Contrast* (Modulation Optics Inc, Greenvale, New York, USA). Kromosom MII diisap dengan mikropipet injeksi dan hanya sedikit cairan ooplasma yang terisap. Setelah itu, pipet ditarik dengan halus dan perlahan hingga melewati zona pelusida. Konfirmasi keberadaan inti/kromosom MII dilakukan dengan cara mewarnai oosit pascaenukleasi dengan Hoechst 33342 (Invitrogen, H1399, Eugene, USA) 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dalam *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (Gibco, 21600-010, Grand Island, NY, USA) tanpa serum selama sepuluh menit, lalu sel oosit diletakkan ke dalam sumur-sumur di dalam cawan Terazaki dan diamati di mikroskop *fluorescent* (Nikon, E600, Japan) dengan panjang gelombang 380nm. Sel oosit yang masih berinti akan terlihat lebih berpendar karena Hoechst 33342 akan berikatan dengan DNA inti. Setelah dipilih yang enukleasinya berhasil, maka sel oosit dipindahkan ke dalam CZB tanpa cytochalasin B dan disimpan selama lebih dari dua jam dalam incubator dengan suhu 37°C dan kadar CO<sub>2</sub> 5%.

**Transfer Inti Sel.** Transfer inti dilakukan menurut Wakayama *et al.*, (2001). Pipet mikromanipulasi injeksi digunakan untuk menarik ke dalam dan keluar sebagian kecil sel kumulus hingga membran plasma rusak, dengan pengamatan menggunakan perbesaran 40x Optik *Hoffman Modulation Contrast* (Modulation Optics Inc, Greenvale, New York, USA). Setelah inti dapat diisap ke dalam pipet, maka dengan pipet yang sama digunakan untuk mengisolasi inti dari sel-sel yang lain. Dalam hitungan menit beberapa inti tersebut diletakkan secara urut dalam sebuah pipet. Inti sel donor (sel kumulus) disuntikan satu per satu ke dalam sel oosit yang telah dihilangkan intinya (enukleasi). Semua manipulasi tersebut dilakukan pada suhu kamar (25–29°C). Dengan menggunakan pendekatan metode tersebut, inti harus disuntikan dalam waktu sekurang-kurangnya sepuluh menit setelah diisolasi dari selnya. Sel oosit yang telah disuntik kemudian dipindahkan dan disimpan dalam media CZB pada suhu 37°C selama 1–3 jam sebelum perlakuan aktivasi.

**Aktivasi Sel Oosit setelah Transfer Inti.** Aktivasi sel oosit setelah transfer inti dilakukan menurut Kishigami *et al.*, (2006) dan Wakayama *et al.*, (2001). Embrio kloning diaktivasi selama enam jam dalam media CZB tanpa Ca<sup>2+</sup> mengandung Sr<sup>2+</sup> 10 mM (Sigma, 255521, St. Louis, USA) dan cytochalasin B 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma, C6762, St. Louis, MO, USA).

#### **Produksi Embrio Partenogenetik**

Produksi embrio partenogenetik dilakukan menurut Murti *et al.*, (2009). Sel oosit hasil isolasi diaktivasi menggunakan kombinasi medium CZB tanpa Ca<sup>2+</sup> dan Mg<sup>2+</sup> dengan cytochalasin B (Sigma, C6762, St. Louis, MO, USA) 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dan strontium chlorida (SrCl<sub>2</sub>) (Sigma, 255521, St. Louis, MO, USA) 10 mM selama enam jam di dalam inkubator (37°C; kadar CO<sub>2</sub> 5%).

#### **Produksi Embrio Fertilisasi**

Mencit betina yang telah dilakukan superovulasi dikandangkan bersama dengan mencit jantan dengan perbandingan 1:1. Identifikasi mencit betina yang telah kawin dengan mencit jantan dilakukan dengan memeriksa sumbat vagina (*vaginal plug*) 15-18 jam setelah penyuntikan hCG (MataHine 2008). Koleksi embrio dilakukan pada hari kedua setelah penyuntikan hCG dengan mencacah oviduk dalam medium M2 menggunakan mikroskop stereo (Nikon, SMZ-2T, Japan). Embrio tahap dua sel atau lebih dimasukkan ke dalam cawan petri dan dicuci sebanyak tiga kali dalam medium CZB tanpa glukosa.

#### **Kultur *In Vitro* Sel Embrio**

Sel embrio hasil fertilisasi *in vivo*, sel embrio kloning hasil aplikasi TISS, dan sel embrio partenogenetik hasil aktivasi dikultur dalam media CZB tanpa glukosa hingga mencapai perkembangan delapan sel, lalu dipindahkan ke *drop* medium CZB yang mengandung D-glukosa 5.55 mM (Merck, 1.08342.0500, Darmstadt, Germany) hingga mencapai tahap blastosis.

#### **Rancangan Penelitian**

Penelitian ini membandingkan perkembangan praimplantasi embrio yang dihasilkan dari TISS (embrio kloning) dengan embrio partenogenetik, dan embrio hasil fertilisasi *in vivo*. Pengamatan mulai dilakukan

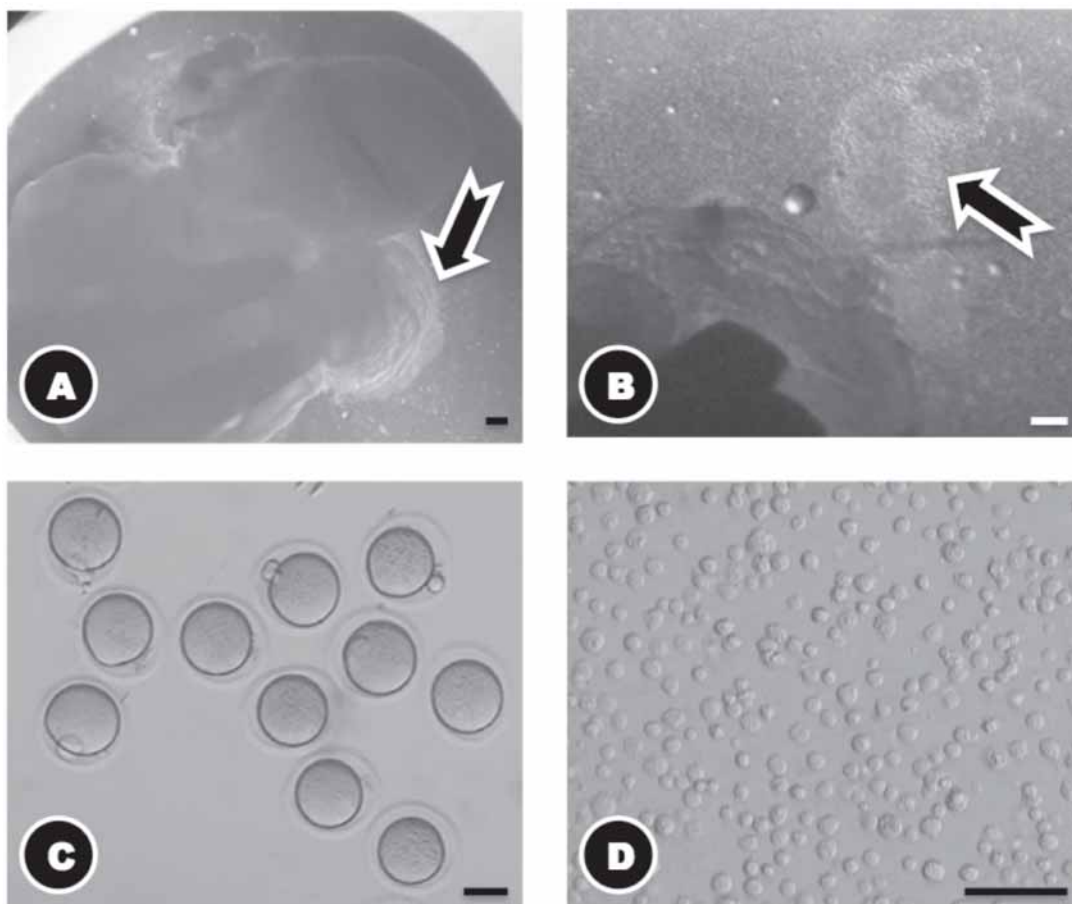
pada embrio tahap satu sel (embrio kloning dan partenogenetik), sedangkan pada embrio hasil fertilisasi mulai dilakukan pada tahap dua sel. Perkembangan embrio diamati hingga kultur hari ketiga dengan asumsi embrio berkembang hingga tahap blastosis.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Penelitian ini menggunakan embrio dari sumber yang berbeda, yaitu fertilisasi *in vivo* (embrio hasil fertilisasi), TISS (embrio kloning), dan partenogenesis (embrio partenogenetik). Embrio fertilisasi merupakan hasil dari pertemuan spermatozoa dengan oosit di dalam oviduk sehingga memiliki materi genetik yang lengkap yaitu paternal dan maternal. Embrio kloning memiliki materi genetik yang berasal dari inti sel somatik yang diploid (2n). Hal ini disebabkan oleh perlakuan enukleasi sebelum dilakukan transfer inti sel somatik. Embrio

partenogenetik hanya memiliki materi genetik yang berasal dari maternal tanpa ada komponen genetik paternal sedikitpun. Walaupun status materi genetik ketiga jenis embrio tersebut berbeda-beda, namun ketiganya memiliki jumlah ploidi yang sama yaitu diploid. Pada TISS dan partenogenetik menggunakan cytochalasin B untuk menghambat pembelahan sitoplasma dengan cara menghalangi pembentukan mikrofilamen kontraktif.

Sel oosit yang digunakan sebagai sumber sel resipien pada aplikasi TISS dan diaktivasi partenogenetik diperoleh dengan cara yang sama (Gambar 1). Isolasi sel oosit diawali dengan memberi perlakuan superovulasi yaitu kombinasi penyuntikan PMSG dan hCG yang berperan menginduksi pertumbuhan folikel dan ovulasi. Perlakuan superovulasi meningkatkan jumlah sel oosit yang diovulasikan oleh mencit betina. *Cumulus-oocyte complex* (COC) yang diperoleh dari penyayatan oviduk lalu dipindahkan pada medium yang mengandung



**Gambar 1.** Isolasi sel oosit dan sel cumulus. A: Anak panah menunjukkan oviduk yang membesar (tempat COC berkumpul), B: *Cumulus-Oocyte Complex* (COC) yang telah dikeluarkan dari oviduk, C: Sel oosit mencit, D Sel Kumulus. Bar = 50  $\mu$ m.

enzim *hyaluronidase*. Enzim tersebut melisiskan senyawa hyaluronat yang banyak terdapat pada matriks sel kumulus yang menyelubungi sel oosit. Embrio fertilisasi dikoleksi pada hari pertama setelah kopulasi sehingga diperoleh sel telur yang telah mengalami ovulasi sudah difertilisasi oleh spermatozoa dan berkembang menjadi embrio tahap dua sel. Oleh karena itu embrio tersebut diisolasi dengan mencacah pada bagian oviduk mencit betina.

### Aktivasi Buatan

Tahap akhir dalam produksi embrio kloning dan partenogenetik adalah aktivasi buatan (*artificial activation*) menggunakan bahan kimia *strontium chloride* ( $\text{SrCl}_2$ ). Senyawa tersebut dapat menginduksi osilasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  secara berulang baik dengan menggantikan ikatan  $\text{Ca}^{2+}$  di dalam sitoplasma maupun dengan menginduksi pelepasan ion  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler (Alberio *et al.*, 2001). Setelah enam jam diaktivasi maka dapat diamati mulai terbentuknya *pseudopronucleus* (pPN). Apabila nampak ada dua pPN pada sitoplasma sel embrio maka dapat dikategorikan sebagai embrio diploid (Gambar 2).

Pada fertilisasi, masuknya spermatozoa ke dalam sel oosit akan menginduksi sinyal  $\text{Ca}^{2+}$  (Schmidt *et al.*, 2006). Pada TISS dan partenogenetik, aktivasi sel oosit tahap MII dapat dilakukan secara elektrik maupun secara kimiawi dengan  $\text{SrCl}_2$  maka konsentrasi MPF menurun secara drastis. Hal ini diduga disebabkan oleh osilasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler (pascaaktivasi) menginduksi serangkaian reaksi biokimia sehingga *Cytostatic factor* (CSF) terdegradasi oleh sistem ubiquitin/*proteosome*. Kompleks CSF yang inaktif menyebabkan *Anaphase Promoting Complex* (APC) aktif dan menghancurkan *cyclin* A dan B sehingga MPF

menjadi tidak aktif /konsentrasi menurun (Elzen dan Pines, 2001).

Pada transfer inti dengan resipien pada tahap MII, konsentrasi MPF yang tinggi dapat menyebabkan inti donor mengalami NEBD dan PCC. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua inti sel pada semua tahap siklus sel mengalami NEBD dan PCC bila ditransfer ke sitoplasma sel oosit yang memiliki konsentrasi MPF tinggi. Namun, bagaimana efek PCC terhadap proses *nuclear reprogramming* belum diketahui secara tuntas hingga saat ini (Sung *et al.*, 2006). Inti donor pada tahap *Growth Zero* ( $G_0$ ), dan *Growth One* ( $G_1$ ) yang masing-masing jumlah kromosomnya diploid (2n) bila ditransfer ke dalam sel oosit resipien pada MII akan terjadi PCC pada kromatid tunggal, lalu mengalami *Nuclear Reformation* (2n) dan akan terjadi replikasi DNA (menjadi 4n) kemudian membelah menjadi dua sel dengan masing-masing kromosom diploid (Campbell *et al.*, 1993).

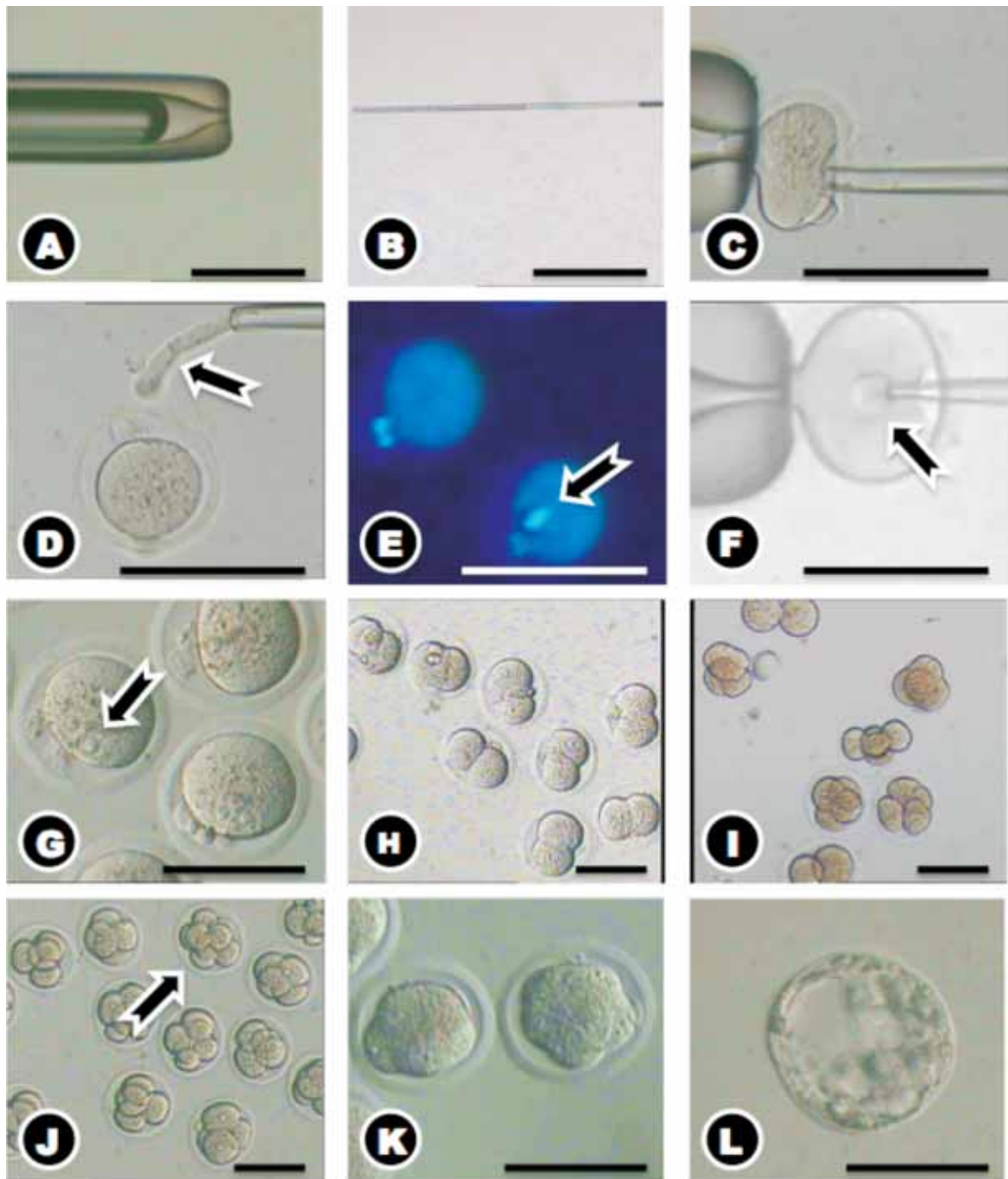
### Perkembangan Kultur Embrio *In Vitro*

Sebanyak 35 dari total 37 atau sekitar 94,5% embrio partenogenetik mampu membelah menjadi tahapan dua sel pada kultur *in vitro*, sedangkan pada aplikasi TISS hanya 31 dari total 43 atau sekitar 72,1% embrio kloning yang dapat mencapai tahap pembelahan dua sel (Tabel 1). Hal ini diduga pada aplikasi TISS terdapat suatu proses *nuclear reprogramming* yang relatif jauh lebih kompleks akibat inti sel somatik yang ditransfer ke dalam sitoplasma sel oosit. Komposisi komponen senyawa aktif dalam sitoplasma sel oosit berbeda dengan dalam sel donor inti (sel kumulus) yang sebelumnya. Status siklus sel oosit pada saat aplikasi TISS adalah sedang dalam tahap Metafase II (pembelahan sel), sedangkan status siklus sel kumulus pada tahap  $G_0$  atau  $G_1$ .

Tabel 1. Tahapan perkembangan kultur embrio secara *in vitro*

Tahapan perkembangan	Embrio fertilisasi	Embrio partenogenetik	Embrio kloning
$\Sigma$ sel oosit	<i>in vivo</i>	37	43
Dua sel	27	35	31
Empat sel	26 (96,3%)	23 (65,7%)	18 (58,1%)
Delapan sel	26 (96,3%)	12 (34,3%)	4 (12,9%)
Morula	26 (96,3%)	6 (17,1%)	2 (6,5%)
Blastosis	15 (55,6%)	3 (8,6%)	1 (3,2%)

Keterangan: Persentase diperoleh dari nilai tahap dua sel dalam kolom yang sama.



**Gambar 2.** Aplikasi Transfer Inti Sel Somatik (A – F) dan tahapan perkembangan embrio kloning (G – L). A: Pipet mikromanipulasi *holding*, B: Pipet mikromanipulasi injeksi, C: Proses enukleasi, D: Anak panah menunjukkan materi genetik yang dienukleasi, E: Hasil pewarnaan Hoechst 33342 terhadap sel oosit yang telah dienukleasi, anak panah menunjukkan masih ada materi genetik maternal yang belum dikeluarkan, F: Transfer inti sel kumulus ke dalam sitoplasma sel oosit yang telah dienukleasi, anak panah menunjukkan materi genetik yang dimasukkan, G: Anak panah menunjukkan *Pseudopronucleus* yang diploid, H: Embrio kloning tahap dua sel, I: Embrio kloning tahap empat sel, J: Embrio kloning tahap delapan sel, K: Embrio kloning tahap Morula, L: Embrio kloning tahap Blastosis. Bar = 100  $\mu$ m.

Embrio fertilisasi yang mencapai tahap empat sel memiliki prosentase 96,3%, embrio partenogenetik lebih rendah yang mencapai tahap empat sel yaitu 65,7%, sedangkan pada embrio kloning hanya 58% yang mampu mencapai tahap pembelahan empat sel (Tabel 1). Pada perkembangan embrio mencit yang dikultur secara *in vitro* terdapat fenomena *two cell block* (hambatan pada tahap dua sel). Hal ini diduga disebabkan oleh pergantian kontrol sintesis RNA dan protein yang awalnya dikendalikan oleh genetik maternal menjadi kombinasi antara maternal dan paternal. Salah satu cara untuk mencegah terjadinya hal ini adalah dengan menambahkan *Ethylene Diamine Tetra Acetate* (EDTA) ke dalam medium kultur. Pada penelitian ini fenomena "*two cell blocks*" telah berhasil dicegah, karena pada kultur embrio fertilisasi di atas 95% berhasil mencapai tahap empat sel. Ketidakberhasilan perkembangan embrio partenogenetik dan embrio kloning dalam mencapai tahapan empat sel diduga karena permasalahan genetik masing-masing sehingga proses sintesis protein dan metabolisme tidak dapat berjalan seperti pada embrio normal (fertilisasi). Beberapa hal yang menjadi permasalahan genetik dalam proses *nuclear reprogramming* adalah *genomic imprinting* dan *X-chromosome inactivation*. Kedua fenomena tersebut secara dominan mempengaruhi modifikasi epigenetik dan pola ekspresi genetik pada sel embrio hasil TISS (Latham 2005).

Menurut Yang *et al.*, (2007) embrio kloning mengalami hipermetilasi DNA, yaitu adanya gugus metil (CH<sub>3</sub>) pada urutan DNA yang berikatan dengan atom C nomor lima pada *cytosine* sedangkan pada histon justru kebalikannya yaitu apabila kehilangan gugus *acetyl* maka struktur kromatin akan mengalami kompaksi. Kromatin yang mengalami kompaksi dapat membuat gen-gen yang terkandung di dalamnya tidak dapat diekspresikan dengan normal. Hal ini sama seperti pada urutan DNA yang mengalami metilasi, maka gen-gen tidak dapat diekspresikan. Pada perkembangan embrionik, banyak gen-gen yang terlibat dalam sintesis protein yang diperlukan pada setiap tahapan pembelahan sel. Apabila protein yang diperlukan tidak tersedia maka pembelahan atau perkembangan embrio kloning dapat berhenti.

Perkembangan *in vitro* embrio fertilisasi cenderung stabil, namun efisiensi yang mampu

mencapai tahap blastosis hanya 57% sedangkan pada embrio partenogenetik dan embrio kloning menunjukkan pola penurunan yang hampir sama. Embrio kloning yang mampu mencapai tahap blastosis berjumlah satu embrio dari total 43 embrio kloning yang telah diaktivasi (3,2%). Embrio partenogenetik yang berhasil mencapai tahap blastosis berjumlah tiga embrio dari 37 total embrio partenogenetik (8,6%). Keberadaan embrio fertilisasi yang dikultur dengan cara yang sama dengan embrio partenogenetik dan embrio kloning dapat memberikan informasi bahwa tidak ada permasalahan mendasar dalam hal kualitas medium, teknik dan fasilitas kultur yang digunakan pada penelitian ini.

## SIMPULAN

Aplikasi TISS dapat menghasilkan embrio kloning yang mampu berkembang hingga mencapai tahap blastosis. Embrio partenogenetik yang dihasilkan oleh aktivasi buatan dapat berkembang hingga tahap blastosis. Tingkat efisiensi embrio partenogenetik yang mampu mencapai tahap blastosis lebih tinggi dari pada embrio kloning. Embrio fertilisasi menunjukkan perkembangan yang lebih baik dan efisien dibandingkan dengan embrio kloning dan embrio partenogenetik pada kultur *in vitro*.

## SARAN

Penelitian lebih mendalam perlu dilakukan agar dapat ditemukan suatu upaya meningkatkan efisiensi produksi dan perkembangan *in vitro* embrio kloning dan embrio partenogenetik.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional atas dukungan dana penelitian melalui DIPA IPB No: 11/I3.24.4/SPK-PUS/IPB/2012. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada instansi Stem Cell and Cancer Institute (PT. Kalbe Farma, Tbk.) yang turut mendukung penelitian ini.



## DAFTAR PUSTAKA

- Alberio R, Zakhartchenko V, Motlik J, Wolf E. 2001. Mammalian oocyte activation: lesson from the sperm and implications for nuclear transfer. *International Journal of Developmental Biology* 45:797-809.
- Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. 1995. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod Fertil Dev* 7:1073-1079.
- Campbell KHS, Ritchie WA, Wilmut I. 1993. Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid and development. *Biology of Reproduction* 49:933-942.
- Choi YH, Love LB, Westhusin ME, Hinrichs K. 2004. Activation of equine nuclear transfer oocytes: methods and timing of treatment in relation to nuclear remodeling. *Biology of Reproduction* 70:46-53.
- Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, Richards C, Lanza RP, West MD. 2001. Somatic cell nuclear transfer in humans: pronuclear and early embryonic development. *The Journal of Regenerative Medicine* 2:25-31.
- Colman A. 2000. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. *Cloning* 1:185-200.
- Elzen N den, Pines J. 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase alignment and anaphase. *The Journal of Cell Biology* 153:121-135.
- Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. 2003. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod* 69:896-901.
- Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S. 2003. Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11819-11822.
- Hipp J, Atala A. 2004. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 1:3
- Hochedlinger K, Jaenisch R. 2003. Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and potential for cell therapy. *N Engl J Med* 349:275-286.
- Kishigami S, Wakayama S, Van Thuan N, et al. 2006. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nature Protocols* 1:125-138.
- Kodifis T, de Bruin JL, Yamane T, Balsam LB, Lebl DR, Swijnenburg RJ, Tanaka M, Weissman IL, Robbins RC. 2004. Insulin-like growth factor promotes engraftment, differentiation, and functional improvement after transfer of embryonic stem cells for myocardial restoration. *Stem Cells* 22:1239-1245.
- Latham KE. 2005. Early and delayed aspects of nuclear reprogramming during cloning. *Biol. Cell* 97:119-132.
- Lin H, Lei J, Wininger D, Nguyen MT, Khanna R, Hartmann C, Yan WL, Huang SC. 2003. Multilineage potential of homozygous derived from metaphase II oocytes. *Stem Cells* 21:152-161.
- Loi P, Ledda S, Jr JF, Cappai P, Moor RM. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biology of Reproduction* 58:1177-1187.
- MataHine T, Supriatna I, Sajuthi D, Boediono A. 2008. Produksi embryonic stem cells dari inner cell mass blastosis yang diisolasi dengan metode enzimatik dan immunosurgery. *Jurnal Veteriner* 9:13-19
- McLaren A. 2000. Cloning: pathway to a pluripotent future. *Science* 288:1775-1780.
- Murti H, Boediono A, Fahrudin M, Sardjono CT, Setiawan B, Sandra F. 2009. Optimization of activation methods for mouse oocytes using calcium-free CZB medium, SrCl<sub>2</sub>, and cytochalasin B *in vitro*. *Jurnal Kedokteran Maranatha* 8:113-120.
- Murti H, Fahrudin M, Sardjono CT, Setiawan B, Sandra F. 2008. Altered nuclear transfer: improvement of somatic cell nuclear transfer technique to resolve ethical problems. *Cermin Dunia Kedokt.* 161: 61-63.
- Paek HJ, Moise LJ, Morgan JR, Lysaght MJ. 2005. Origin of insulin secreted from islet-like cell clusters derived from murine embryonic stem cells. *Cloning and Stem Cells* 7:226-231.
- Piedrahita JA, Mir B, Dindot S, Walker S. 2004. Somatic cell cloning: the ultimate form of nuclear reprogramming?. *J Am Soc Nephrol* 15:1140-1144.
- Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science* 119:1213-1218.
- Sung LY, Shen P, Jeong BS, et al. 2006. Premature chromosome condensation is not essential for nuclear reprogramming in

- bovine somatic nuclear transfer. *Biology Reproduction* 76(2):232-240.
- Vincent C, Cheek TR, Johnson MH. 1992. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *Journal of Cell Science* 103:389-396.
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with kumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
- Wakayama T, Tabar V, Rodriguez I, Perry ACF, Studer L, Mombaerts P. 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292:740-743.
- Wakayama T, Yanagimachi R. 2001. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction* 122:49-60.
- Wobus AM, Boheler KR. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85:635-678.
- Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nature Genetics* 39(3):295-302.