

Agregasi Embrio Tahap Pembelahan 8 Sel pada Medium Kultur KSOMaa untuk Menghasilkan Embrio Hasil Agregasi dengan Nilai Viabilitas yang Tinggi: Kajian pada Hewan Model Mencit (*Mus musculus*)

Sunarno¹

¹ Laboratorium Biologi Struktur dan Fungsi Hewan Jurusan Biologi FMIPA Undip

ABSTRAK---Agregasi atau penggabungan embrio untuk menghasilkan embrio dengan kualitas unggul dapat dilakukan pada tahap awal perkembangan embrio sampai sebelum embrio mencapai tahap morula kompak. Agregasi embrio dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: agregasi antar embrio tanpa zona peluzida menjelang proses kompaksi dan agregasi embrio tahap aawal yang masih mempunyai blastomer dengan konfigurasi longgar satu sama lain. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai viabilitas embrio hasil agregasi pada medium KSOMaa melalui proses agregasi embrio tahap pembelahan 8 sel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa medium KSOMaa mampu menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan embrio tahap pembelahan 8 sel sehingga dihasilkan embrio hasil agregasi dengan nilai viabilitas yang tinggi. Untuk mendukung proses agregasi sehingga dihasilkan embrio dengan nilai viabilitas yang tinggi dalam sistem kultur *in vitro*, harus memperhatikan beberapa faktor, antara lain sumber gas CO₂, nutrisi (medium), substrat (wadah) dan suhu inkubasi. Dalam mempersiapkan medium juga harus diperhatikan beberapa hal penting, seperti sumber air yang digunakan sebagai pelarut, sifat fisik seperti osmolaritas, pH serta komposisi media yang disesuaikan dengan kebutuhan pertumbuhan dan perkembangan embrio.

Keywords: kultur in vitro, agregasi, embrio, viabilitas, mencit (Mus musculus)

PENDAHULUAN

Pengembangan penelitian, terutama bioteknologi embrio terus mengalami peningkatan dalam rangka untuk menjawab permasalahan yang dihadapi oleh manusia, seperti masalah pangan, kesehatan, pelestarian atau konservasi hewan langka, serta masalah reproduksi. Pengembangan bioteknologi embrio memfokuskan pada upaya untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas individu dengan menggunakan hewan model yang kemudian akan ditindaklanjuti untuk diterapkan pada hewan-hewan budidaya yang mempunyai hubungan kekerabatan dekat dengan hewan model yang digunakan. Teknik yang sering digunakan untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas tersebut adalah teknik kultur embrio secara *in vitro*.

Dalam kultur embrio salah satu hal penting yang harus dapat dicapai adalah nilai viabilitas embrio yang tinggi. Untuk mendapatkan nilai viabilitas embrio yang tinggi harus memperhatikan beberapa faktor, antara lain: teknik kultur yang digunakan, medium kultur, umur embrio, kadar CO₂, suhu inkubasi, lingkungan yang steril dan lain-lain. Berkaitan dengan hal tersebut penelitian tentang teknik kultur yang digunakan, pembuatan media dengan komposisi yang

sesuai untuk kebutuhan embrio, pemilihan dan penentuan umur embrio, serta teknik manipulasi lingkungan yang tepat sehingga dapat diperoleh embrio dengan viabilitas yang tinggi perlu dilakukan dalam rangka menghasilkan hewan dalam jumlah banyak dalam waktu yang singkat dan berkualitas

Bioteknologi embrio (BE) adalah produk atau proses biologis untuk menghasilkan embrio dalam skala besar dan bercorak industri. Bioteknologi embrio melibatkan kegiatan produksi dan kriopreservasi embrio, teknologi produksi dan perekayasaan atau manipulasi embrio untuk meningkatkan produksi ternak dan teknologi bantuan reproduksi (*assisted reproduction technology*) pada satwa langka (Wildt, 1989). Bioteknologi embrio juga telah dimanfaatkan untuk membantu meningkatkan kesehatan manusia melalui pengembangan *embryonic stem cell*, *germcell gene therapy*, serta pembuatan hewan transgenik sebagai pabrik produksi bahan biologis. Dengan demikian, bioteknologi embrio memiliki potensi aplikasi yang sangat luas, antara lain untuk optimalisasi produksi dan pemanfaatan sumber embrio, meningkatkan mutu atau nilai tambah embrio, produksi bahan biologis dan biomedis serta eksplorasi informasi dasar. Produk yang

dihasilkan dapat dimanfaatkan untuk mendukung peningkatan produksi ternak, konservasi satwa liar dan kesehatan manusia.

Penerapan Bioteknologi embrio dapat dilakukan melalui pendekatan sistem *in vivo* atau sistem *in vitro*. Produksi dan rekayasa embrio secara *in vitro* diperlukan sistem kultur *in vitro* yang memadai. Sistem kultur memegang peranan penting dalam keberhasilan pertumbuhan dan perkembangan embrio. Keuntungan sistem *in vitro* adalah untuk mempelajari perkembangan embrio, mengetahui penyebab kematian embrio, mengetahui pengaruh medium dan faktor eksternal lainnya terhadap viabilitas embrio serta sintesa protein pada perkembangan transisi antara maternal-embriolik.

Penerapan bioteknologi embrio salah satunya adalah melalui teknik agregasi embrio secara *in vitro*. Untuk mendapatkan embrio sesuai yang diinginkan perlu diperhatikan berbagai macam faktor yang menunjang keberhasilan sistem kultur embrio secara *in vitro*. Keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* secara garis besar ditentukan oleh 2 hal, yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal menyangkut potensi genetik dari embrio itu sendiri. Berkaitan dengan faktor internal, keberhasilan produksi embrio sangat ditentukan oleh tahapan embrio yang akan digunakan sebagai sumber agregasi. Tahapan pembelahan sel, morula dan blastosis merupakan tahapan yang sangat memungkinkan untuk dilakukannya agregasi embrio dalam rangka menghasilkan embrio dengan potensi genetik yang unggul. Faktor eksternal yang mempengaruhi keberhasilan produksi embrio secara *in vitro* meliputi medium kultur, kadar CO₂ dan suhu inkubasi, dan ketiga hal tersebut disesuaikan dengan kebutuhan embrio untuk dapat survival seperti pada keadaan *in vivo*.

Dalam praktek produksi embrio untuk memperoleh embrio dengan potensi genetik unggul sering dilakukan metode agregasi, karena metode ini dianggap paling murah dan paling mudah hanya dengan memanfaatkan potensi yang telah dimiliki embrio. Embrio yang akan diagregasi dapat berasal dari 2 sumber, pertama embrio non klon, yaitu embrio yang merupakan pertumbuhan dari zigot tanpa perlakuan apapun, sedangkan yang

kedua adalah embrio hasil klon yang diperoleh dari hasil splitting.

Beberapa masalah sering dijumpai dalam produksi embrio secara *in vitro*, baik yang menyangkut faktor internal maupun faktor eksternal. Salah satu contoh masalah yang sering dijumpai adalah tingkat viabilitas embrio hasil agregasi yang masih rendah. Rendahnya nilai viabilitas ini sering disebabkan karena belum adanya kesesuaian pemilihan tahapan embrio yang akan digunakan sebagai sumber untuk proses agregasi dengan medium yang akan digunakan. Hambatan yang paling besar dalam produksi embrio secara *in vitro* melalui metode agregasi adalah terjadinya fenomena "cell block" pada pertumbuhan embrio. Keberhasilan produksi embrio sekali lagi sangat ditentukan oleh ketepatan membuat formulasi medium yang disesuaikan dengan usia pertumbuhan embrio yang akan digunakan. Medium sebagai sumber nutrisi untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan embrio terdapat beberapa jenis, mulai dari medium racikan sederhana, seperti M16 (Djuwita *et al.*, 1992; 1993; Sunarti *et al.*, 2000) dipergunakan untuk pertumbuhan embrio mencit, medium CR1AA (Rosenkrans dan First, 1991) untuk pertumbuhan embrio domba dan kambing (Djuwita *et al.*, 1997; 1998) sampai yang lebih kompleks seperti Tissue Culture Medium (TCM) 199 yang secara luas digunakan untuk pertumbuhan embrio dari hewan laboratorium dan ternak (Boediono *et al.*, 1995; Djuwita *et al.*, 1995). Dalam mempersiapkan medium racikan terdapat hal mendasar yang harus diperhatikan, yaitu sumber air yang digunakan sebagai pelarut, sifat fisik seperti osmolaritas dan pH serta komposisi media yang disesuaikan berdasarkan kebutuhan untuk pertumbuhan dan perkembangan embrio.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa produksi embrio hasil agregasi dengan sumber embrio non klon memiliki tingkat viabilitas yang rendah dibanding dengan menggunakan sumber embrio hasil klon. Berdasarkan kenyataan tersebut penelitian ini dilakukan untuk membuktikan apakah agregasi embrio tahap pembelahan 8 sel dengan sumber embrio klon pada medium kultur *in vitro* KSOMaa dapat meningkatkan viabilitas embrio dengan tingkat viabilitas yang lebih tinggi daripada

menggunakan sumber embrio non klon dari penelitian-penelitian yang sudah dilakukan sebelumnya. Pemilihan embrio tahap pembelahan 8 sel dan penetapan formula medium KSOMaa juga akan dikaji dalam penelitian ini.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam praktikum adalah: peralatan bedah (gunting, pinset), syringe 1ml dan needle 26 G, cawan petri kaca, culture disc, mouth pipet, pipet pasteur, mikroskop stereo, mikroskop manipulator

Bahan yang digunakan adalah : embrio mencit tahap 8 sel, medium Phospat Buffer Saline (PBS) dan 2,5 % serum, medium Kalium Simple Optimazed Medium (KSOMaa) dan 0,25% pronase.

Cara Kerja

1. Koleksi dan Seleksi Embrio tahap 8 Sel

- a. Mencit betina yang telah disuperovulasi (injeksi PMSG dan hCG) dikorbankan dengan cara *dislocatio cervicalis* (dislokasi leher) pada hari ke-3 setelah injeksi PMSG dan hCG.
- b. Tuba fallopii diangkat dan diletakkan dalam cawan petri kaca berisi medium PBS (Phospat Buffer Saline) dan 2,5% serum FBS (Fetal Bovine Serum)
- c. Tuba fallopii dicacah dengan menggunakan needle 26 G dibawah mikroskop. Embrio yang diperoleh dikumpulkan dan diseleksi.
- d. Embrio tahap 8 sel yang menunjukkan morfologi blastomer sempurna digunakan untuk proses berikutnya.

2. Agregasi dan Kultur In Vitro Embrio

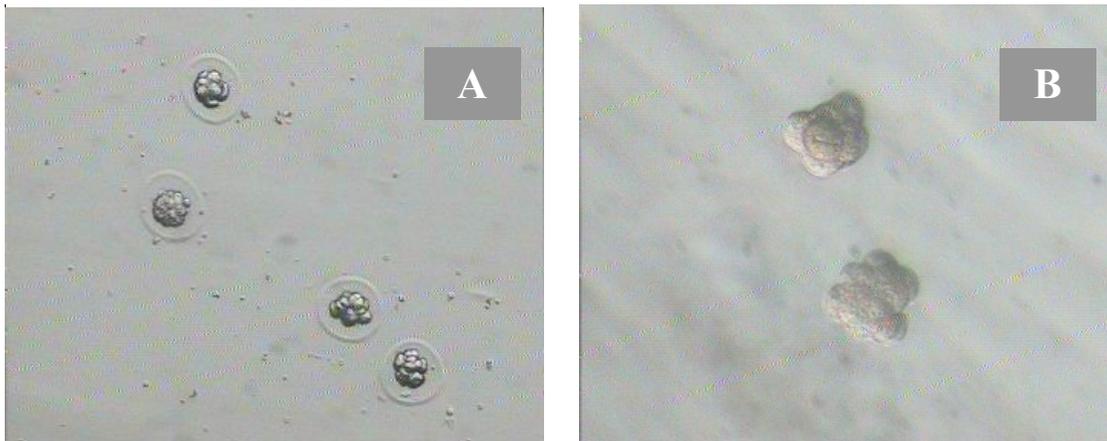
- a. Embrio mencit tahap 8 sel yang akan diagregasi masing-masing dikumpulkan dalam satu drop medium KSOMaa
- b. Untuk menghilangkan zona pelucida, embrio dipindahkan ke dalam medium KSOMaa yang telah diberi 0,25% pronase selama 1-2 menit.
- c. Embrio tanpa zona pelucida dicuci 3 kali dalam larutan KSOMaa, kemudian ditempatkan secara individual dalam drop-drop 10µl dalam medium KSOMaa.

- d. Embrio yang berbeda kemudian ditempatkan berpasangan dalam drop yang sudah diisi oleh embrio sebelumnya
- e. Setiap pasangan embrio didekatkan secara mekanik agar permukaan blastomer saling bersentuhan
- f. Setelah kultur selama 4 jam, agregasi dilakukan kembali pada pasangan embrio yang belum menyatu
- g. Kultur dilanjutkan selama 48 jam agar pasangan embrio dapat melakukan agregasi dengan sempurna.
- h. Dilakukan pengamatan dan penghitungan viabilitas embrio hasil agregasi yang mampu mencapai tahap blastosis

HASIL DAN PEMBAHASAN

Teknik kultur embrio secara in vitro dengan metode agregasi dapat dilakukan melalui urutan tahapan sebagai berikut, yaitu: koleksi embrio, peluruhan zona peluzida embrio dengan enzim pronase 0,25% dan tahap agregasi. Semua tahapan tersebut dilakukan dalam medium KSOMaa yang komposisinya mengandung nutrisi ideal yang diperlukan embrio. Selain itu juga diperlukan lingkungan yang mendukung agar embrio dapat tumbuh dan berkembang secara optimal, misalnya kadar CO₂ harus 5% serta suhu inkubasi 38,5⁰C. Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh data yang merupakan urutan tahapan agregasi, seperti yang terlihat pada gambar 1, gambar 2 dan gambar 3.

Gambar 1 A menunjukkan 4 buah embrio pada tahap pembelahan 8 sel yang masih memiliki zona pelucida dan berada dalam medium kultur KSOMaa. Perlakuan enzim pronase 0,25% menunjukkan bahwa zona peluzida embrio akan mengalami proses peluruhan, seperti yang terlihat pada gambar 1 B. Hal ini disebabkan karena enzim pronase merupakan enzim proteolitik yang mempunyai kemampuan untuk mencerna zona peluzida embrio. Untuk menghindari agar embrio tidak mengalami kematian, enzim pronase harus diberikan dalam konsentrasi yang tepat. Setelah zona pelucida embrio mengalami peluruhan secara sempurna maka embrio-embrio dalam medium kultur KSOMaa siap untuk diagregasi (Gambar 1B) untuk mendapatkan embrio yang berkualitas.



Gambar 1. Peluruhan zona peluzida embrio tahap 8 sel dengan 0,25% pronase dalam drop medium KSOMaa (A: embrio tahap 8 sel dengan peluruhan zona peluzida oleh pengaruh pronase, B: embrio tahap 8 sel tanpa zona peluzida yang siap diagregasi).

Keberhasilan proses agregasi embrio dalam kultur in vitro sangat ditentukan oleh medium yang digunakan. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa medium KSOMaa merupakan medium yang cocok untuk proses agregasi embrio. Medium KSOMaa terdiri berbagai macam komponen nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan embrio. Komponen nutrisi tersebut, antara lain glukosa, protein, asam-asam amino, vitamin, serum, mineral. Untuk mencegah kontaminasi bakteri atau jamur pada medium kultur, dalam

medium KSOMaa sudah mengandung antibiotik, seperti gentamicin. Dalam medium kultur juga mengandung EDTA (larutan stok D) yang berfungsi untuk mencegah terjadinya fenomena “cell block) pada pertumbuhan embrio dalam medium kultur in vitro granulosa (Jiang *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1992). Komposisi nutrisi yang seimbang pada medium KSOMaa akan bermanfaat bagi pertumbuhan dan perkembangan embrio yang akan diagregasi maupun embrio hasil agregasi secara optimal. Komposisi medium KSOMaa dapat dilihat pada tabel sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi medium KSOMaa

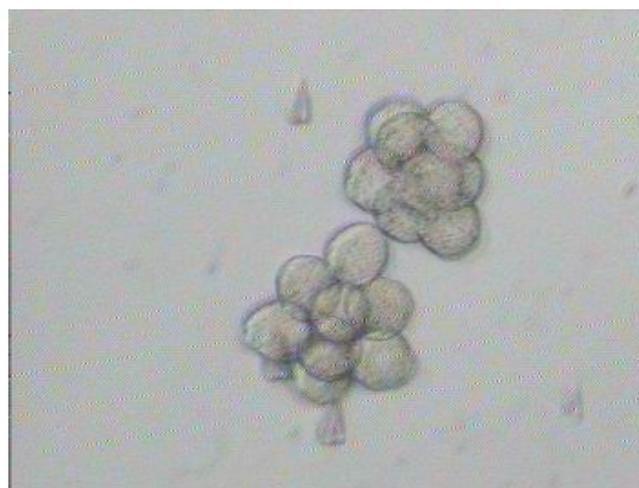
Komponen	100 ml	10 ml	5 ml
Larutan Stok A (ml)	50	5	2,5
Air Milli Q (ml)	44,5	4,45	2
Larutan Stok B (ml)	1	0,1	0,05
EAA	1	0,1	0,05
NEAA	0,5	0,05	0,025
BSA 0,4% (g)	0,4	0,04	0,02
Gentamicin 50 µg/ml (µl)	100	10	5
Larutan Stok D (ml)	1	0,1	0,05

Keterangan: Osmolaritas 260; medium disterilisasi dengan menggunakan mikrofilter 0,22 µm. Ekuilibrisasi medium sebelum digunakan. Medium dapat digunakan selama 1-2 minggu apabila disimpan dalam suhu 4°C.

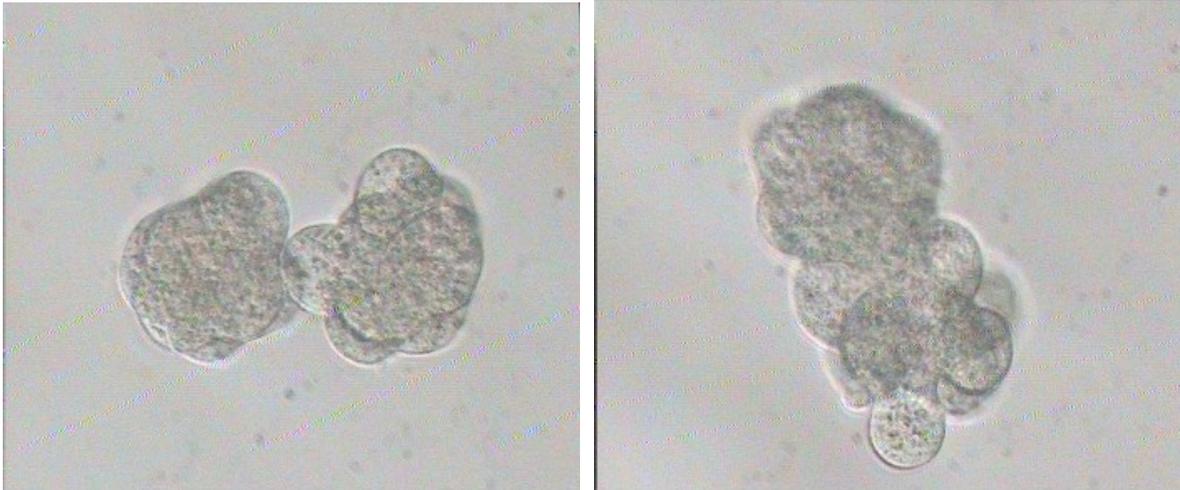
Tabel 2. Komposisi larutan Stok dalam medium KSOMaa

Larutan Stok		Komponen	BM (g/mol)	mM	g/100 ml	g/50 ml	g/10 ml
Larutan (2x solution)	Stok A	NaCl	58,44	95	1,1100	0,5550	0,1110
		KCl	74,56	2,5	0,0372	0,0186	0,0037
		KH ₂ PO ₄	136,09	0,35	0,0094	0,0047	0,0009
		MgSO ₄ .7H ₂ O	246,48	0,2	0,0099	0,0050	0,0010
		Sodium laktat	109,1	10	0,2182	0,1091	0,0224
		Sodium piruvat	110,05	0,2	0,00440	0,0022	0,0004
		D-Glukosa	180,16	5,5	0,2000	0,1000	0,0200
		Glisil-Glutamin Hidrat	146,1	2	0,0584	0,0292	0,0081
		NaHCO ₃	84,01	25	0,4200	0,2100	0,0420
		Phenol Red 0,5% (μ l)			200	100	20
Larutan (100x solution)	Stok B	CaCl ₂ .2H ₂ O	147	1,71			0,2512
Larutan (100xsolution)	Stok D	EDTA*	372,2	0,01			0,00372

Keterangan: * Dilarutkan dalam 200 μ l NaOH 1 N, kemudian ditambahkan 4,8 ml air Milli Q



Gambar 2. Penyiapan pasangan embrio yang siap diagregasi dalam medium kultur KSOMaa



Gambar 3. Agregasi embrio dalam medium kultur KSOMaa (A: agregasi awal, B: agregasi tahap lanjut)

Agregasi embrio atau penggabungan embrio untuk menghasilkan embrio dengan nilai viabilitas yang tinggi dapat dilakukan pada tahap awal perkembangan embrio sampai sebelum embrio mencapai tahap morula kompak (Kelly et al., 1978). Dalam penelitian ini embrio yang digunakan dalam proses agregasi adalah embrio dengan tahap pembelahan 8 sel dan terbukti mampu menghasilkan embrio dengan nilai viabilitas yang tinggi. Blastomer embrio tahap 8 sel biasanya membentuk konfigurasi longgar dengan banyak ruang diantara blastomer. Setelah blastomer-blastomer mengalami pembelahan berikutnya, blastomer-blastomer tersebut akan mengalami perubahan fisiologis yang dramatis untuk tumbuh dan berkembang memasuki tahap berikutnya.

Selama berada dalam tahap pertumbuhan dan perkembangan, embrio hasil agregasi secara terus menerus mengalami perubahan, yaitu peningkatan ukuran diameter, aktivitas transkripsi dan kandungan sitoplasma. Pada pematangan sitoplasma terjadi perubahan molekuler dan struktural yaitu terjadinya peningkatan yang pesat terhadap jumlah maupun ukuran organel seperti ribosom, butir-butir lemak, apparatus golgi dan mitokondria. Perubahan kandungan sitoplasma tergambar pada embrio hasil agregasi pada gambar 3 B.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan membuktikan bahwa medium KSOMaa mampu menstimulasi pertumbuhan dan perkembangan embrio pada tahap pembelahan 8 sel dalam proses agregasi, sehingga dapat menghasilkan embrio hasil agregasi dengan viabilitas yang tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wildt, D. E. 1989. Strategies for practical application of reproduction technologies to endangered species. *Zoo Biol., (Suppl)*: 17-20
2. Djuwita, I dan Boediono, A. 1992. *Pembuatan hewan Khimaera dari mencit strain CBR dan C3H. Prosiding lokakarya: penelitian komoditas dan studi kasus*. Volume II. Bogor. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Departemen Pertanian.
3. Djuwita, I., A. Boediono., S. Golfiani, M. Fahrudin dan Y. Sukra. 1993. *Studi perbandingan perkembangan in vitro dari embrio paruh yang dihasilkan melalui teknik pembelahan dan pemisahan blastomer pada mencit*. Prosiding Lokakarya Teknologi Konservasi Fauna. Jakarta. Direktorat Teknologi Pemukiman dan Lingkungan Hidup. BPP Teknologi.

4. Sunarti, I. Djuwita dan Y. Sukra. 2000. Pengaruh umur induk terhadap perkembangan embrio secara in vitro pada mencit. *Med. Vet.* Vol. 7 (4): 18-21
 5. Rosenkrans, CF and NL First. 1991. Effect of free amino acids and vitamin on cleavage and development rate of bovine zygotes in vitro. *J Anim Sci*; 72: 434-437
 6. Djuwita, I., Y. Rusyantono, B. Purwantara and Y. Sukra. 1997. *Influence of estrous serum in culture medium on in vitro maturation, fertilization and early development in sheep.* International Meeting on Biotechnology of Animal Reproduction. Indonesia.
 7. Djuwita, I., Y. Rusyantono, K. Mohamad., B. Purwantara and Y. Sukra. 1998. Pengaruh serum homolog dan heterolog terhadap proses pematangan dan pembuahan oosit di dalam medium biakan in vitro. *Media Veteriner*, Vol. 7(1): 5-8
 8. Boediono, A., R. Rajamahendran, S. Saha, C. Sumantri and T. Suzuki. 1995. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocytes number, cleavage rate and blastocysts production in vitro in cattle. *Theriogenology*; 43:169
 9. Djuwita, I., B. Purwantara., M. Fahrudin dan Y. Sukra. 1995. Pengaruh siklus estrus terhadap perkembangan oosit sapi hasil pematangan dan pembuahan in vitro. *Media Veteriner*; 3 (1): 17-22
 10. Jiang HS, WL Wang, KH Lu, I Gordon and C Polge. 1991. Roles of different cell monolayers in the co-culture of IVF bovine embryos. *Theriogenology*; 35: 216 (Abstr).
 11. Walker, SK, RJ Lampe and RF Seamark. 1992. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentration of sodium bicarbonate and hepes. *Theriogenology*; 37:797-804
 12. Kelly, SJ., Mulnard JG. And Graham CF. 1978. Cell division and cell allocation in early mouse development. *J Exp Zool*; 200: 365-376
-