

Produksi Embrio Kembar Identik Melalui Bedah Mikro pada Embrio Kambing Hasil In Vitro

(PRODUCTION OF MONOZYGOTIC TWINS OF IN VITRO PRODUCED GOAT EMBRYO BY EMBRYO SPLITTING)

ARIEF BOEDIONO

Laboratorium Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680. E-mail: ab1@cbn.net.id

ABSTRAK

Penelitian dilakukan untuk mengembangkan produksi embrio kembar identik pada kambing melalui teknik bedah mikro pada embrio hasil produksi fertilisasi in vitro. Produksi embrio secara in vitro dilakukan dengan melakukan fertilisasi oosit yang telah matang dengan spermatozoa yang diseleksi dengan metode swim up. Kultur in vitro untuk mencapai tahap morula (hari ke-5) dan blastosis (hari ke-8) dilakukan dalam medium CR1aa. Produksi embrio kembar identik pada kambing tahap perkembangan morula dan blastosis dilakukan dengan metode bedah mikro (splitting) pada embrio yang diproduksi melalui teknologi fertilisasi in vitro. Pemotongan embrio-utuh dilakukan dengan metode sederhana tanpa menggunakan pipet holding dan pemotongan dilakukan menggunakan modifikasi pisau silet. Teknik pemotongan embrio kambing tahap morula relatif lebih mudah daripada tahap blastosis karena orientasi yang lebih mudah. Namun demikian viabilitas embrio-paruh pada kultur in vitro hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah daripada embrio tahap blastosis. Keberhasilan pemotongan dengan orientasi ICM didapatkan tingkat keberhasilan yang tidak berbeda nyata.

Kata-kata kunci: embrio kambing, kultur in vitro, kembar identik, morula, blastosis

J Vet 2005 6 (2) : 39 - 46

ABSTRACT

This study was designed to improve the production of monozygotic twins of in vitro produced goat embryo by embryo micro-surgery. The goat embryos were produced in vitro by fertilizing the matured oocytes with selected sperm using swim up method. Embryos were cultured in vitro in CR1aa medium up to morula (day-5) and blastocyst stages (day-8). The production of monozygotic twins embryos were done by embryo splitting (at morula and blastocyst stages) with the simple method (without using holding pipette). The embryo splitting procedure at morula stage was relatively easier than that of blastocyst stage. However, the viability rate of demi-embryo after 3 or 24 hours cultured in vitro was higher in blastocyst than in morula. According to the ICM present in demi-embryos, overall results shows that the success rate of embryo splitting at the morula and blastocyst stages was similar.

Key words: Goat embryo, in vitro culture, monozygotic twins, morula, blastocyst.

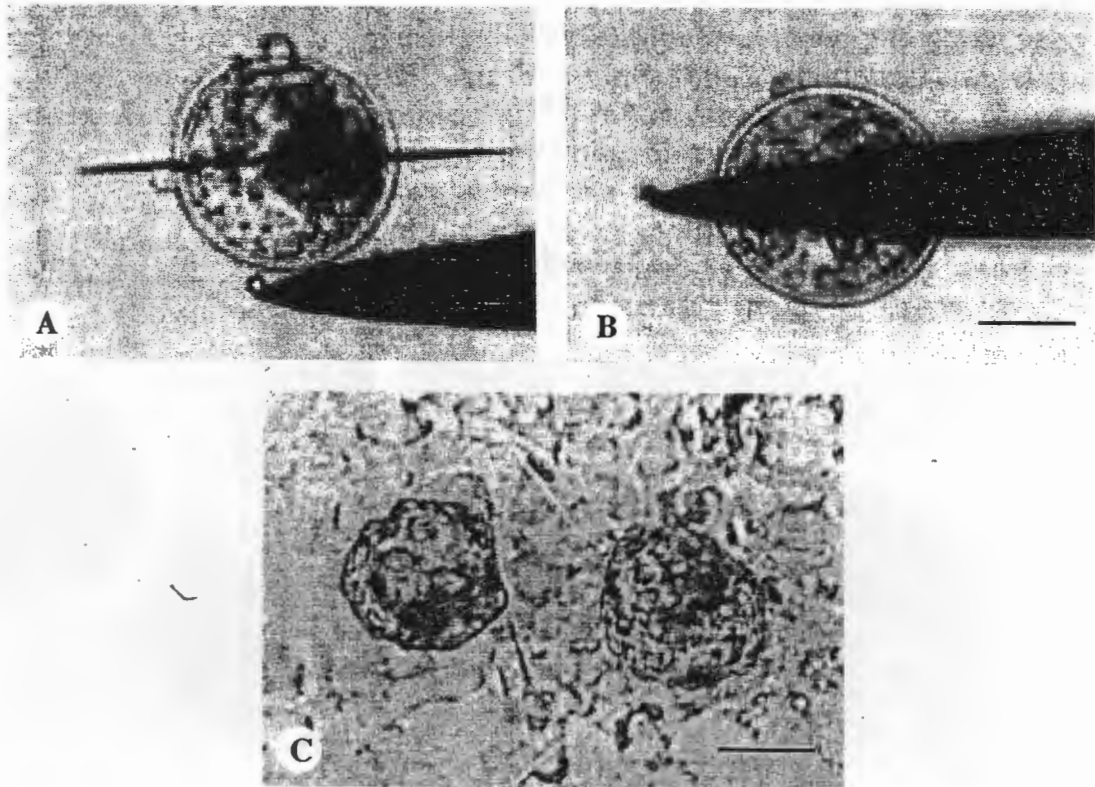
J Vet 2005 6 (2) : 39 - 46

Bedah Mikro Embrio:

Embrio tahap morula atau blastosis hasil perkembangan *in vitro* digunakan untuk pembuatan kembar identik dengan metode bedah mikro. Pisau mikro yang digunakan juga merupakan pisau mikro modifikasi yang dibuat dengan memanfaatkan pisau silet yang terbuat dari baja. Pisau mikro dibuat dengan mematahkan bagian ujung pisau silet menggunakan tang mulut buaya sehingga didapatkan potongan ujung silet yang tajam. Setelah dilakukan sterilisasi dengan panas, potongan pisau mikro dilekatkan pada pipa kapiler (Narishige, Japan) yang sudah dibentuk sesuai dengan keperluan menggunakan perekat yang kuat.

Bedah mikro embrio dilakukan dengan metode sederhana dengan

memotong sekaligus zona pellusida dan blastomer menggunakan pisau mikro (*micro blade*) tanpa menggunakan pipet holding seperti yang dilaporkan oleh Nowshari dan Holtz (1993) dengan beberapa modifikasi. Bedah mikro embrio dilakukan di bawah mikroskop inverted (Nikon, Japan) yang dilengkapi dengan perangkat manipulasi mikro (Narishige, Japan). Pemotongan embrio dilakukan dalam 10 ul drop medium mPBS(-) untuk satu embrio-utuh per drop pada cawan petri (Falcon 1006, USA) yang ditambahkan mineral oil (Sigma, USA) di atasnya untuk mencegah penguapan medium. Untuk ketepatan orientasi pemotongan dan mencegah embrio bergerak (menggelinding) dibuat goresan terdahulu pada cawan petri. Pemotongan embrio dilakukan dengan menempatkan



Gambar 2. Pembuatan kembar identik dengan metode bedah mikro pada blastosis kambing: (A) Goresan pada dasar cawan petri sebagai tempat orientasi ICM dan trofoblas, (B) Awal penyayatan dengan orientasi ICM dan trofoblas, (C) Embrio-paruh (kembar identik) setelah penyayatan dan kultur *in vitro* selama 3 jam. Bar: 50 μm .

modifikasi *phosphate buffered saline* (mPBS). Oosit hasil koleksi kemudian dicuci tiga kali dan dikultur *in vitro* dalam medium maturasi yang terdiri dari CR1aa yang ditambahkan dengan serum kambing 10%, *folicle stimulating hormone* (FSH; Denka, Kawasaki, Japan) 0,01 mg/ml dan gentamicin sulfat (Sigma, USA) 50 mg/ml. Maturasi oosit secara *in vitro* dilakukan dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C dengan periode inkubasi 24 jam.

Fertilisasi *In Vitro*:

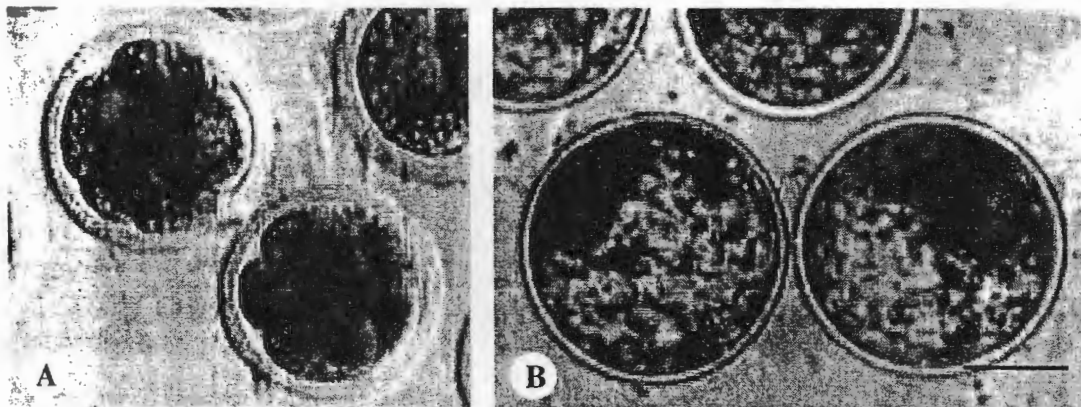
Spermatozoa yang digunakan untuk penelitian ini adalah spermatozoa segar. Spermatozoa segar dikoleksi dari pejantan dengan menggunakan vagina buatan. Seleksi spermatozoa motil yang akan digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dilakukan dengan modifikasi metode *swim up* seperti yang pernah dilaporkan oleh Purvis dan Egdetveit (1993). Spermatozoa dicuci dengan sentrifugasi sebanyak dua kali masing-masing dengan kecepatan 500G selama lima menit dalam larutan CR1aa yang telah ditambahkan kafein (Sigma, USA) 2,5 mM (Younis, *et al.*, 1991). Spermatozoa hasil pencucian

ditambahkan dengan medium yang sama sebanyak 1 ml dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C selama 1 jam untuk memberi kesempatan spermatozoa motil berenang ke atas. Hanya spermatozoa yang dapat berenang ke atas yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dengan konsentrasi 2,5 x 10⁶ spermatozoa/ml.

Oosit yang telah matang, dicuci dalam medium fertilisasi (Kaf-CR1aa) sebanyak 3 kali kemudian dilakukan fertilisasi dalam medium drop/tetes sebanyak 100 ml berisi sebanyak 20-30 oosit per drop. Fertilisasi *in vitro* dilakukan selama 18 jam dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 38,5°C.

Perkembangan Embrio *In vitro*:

Zigot hasil fertilisasi *in vitro* dicuci dari medium inseminasi untuk selanjutnya dilakukan kultur dalam medium CR1aa dengan penambahan insulin (Sigma, USA) 5 µg/ml, gentamicin sulfat 50 µg/ml dan serum kambing sebanyak 10% sampai perkembangan embrio hari kelima (tahap morula) dan hari kedelapan tahap blastosis (Gambar 1).



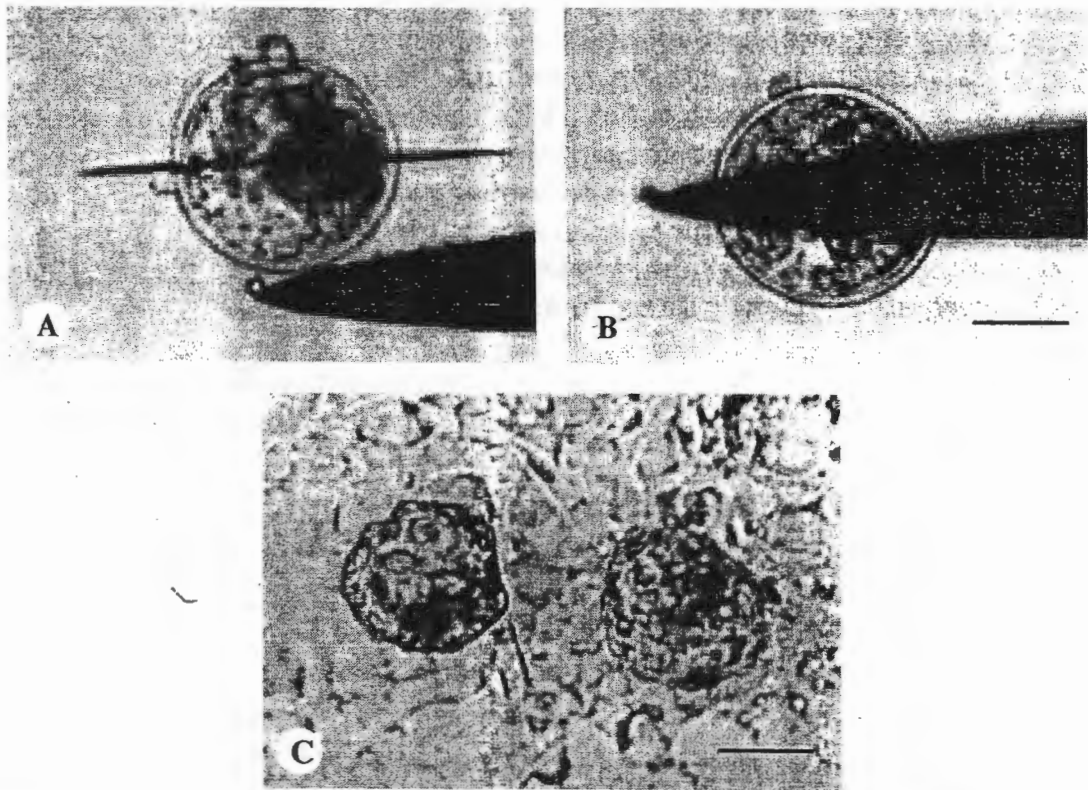
Gambar 1. Embrio kambing hasil produksi *in vitro*. (A) pada tahap perkembangan morula dan (B) blastosis. Bar: 50 µm.

Bedah Mikro Embrio:

Embrio tahap morula atau blastosis hasil perkembangan *in vitro* digunakan untuk pembuatan kembar identik dengan metode bedah mikro. Pisau mikro yang digunakan juga merupakan pisau mikro modifikasi yang dibuat dengan memanfaatkan pisau silet yang terbuat dari baja. Pisau mikro dibuat dengan mematahkan bagian ujung pisau silet menggunakan tang mulut buaya sehingga didapatkan potongan ujung silet yang tajam. Setelah dilakukan sterilisasi dengan panas, potongan pisau mikro dilekatkan pada pipa kapiler (Narishige, Japan) yang sudah dibentuk sesuai dengan keperluan menggunakan perekat yang kuat.

Bedah mikro embrio dilakukan dengan metode sederhana dengan

memotong sekaligus zona pellusida dan blastomer menggunakan pisau mikro (*micro blade*) tanpa menggunakan pipet holding seperti yang dilaporkan oleh Nowshari dan Holtz (1993) dengan beberapa modifikasi. Bedah mikro embrio dilakukan di bawah mikroskop inverted (Nikon, Japan) yang dilengkapi dengan perangkat manipulasi mikro (Narishige, Japan). Pemotongan embrio dilakukan dalam 10 ul drop medium mPBS(-) untuk satu embrio-utuh per drop pada cawan petri (Falcon 1006, USA) yang ditambahkan mineral oil (Sigma, USA) di atasnya untuk mencegah penguapan medium. Untuk ketepatan orientasi pemotongan dan mencegah embrio bergerak (menggelinding) dibuat goresan terdahulu pada cawan petri. Pemotongan embrio dilakukan dengan menempatkan



Gambar 2. Pembuatan kembar identik dengan metode bedah mikro pada blastosis kambing. (A) Goresan pada dasar cawan petri sebagai tempat orientasi ICM dan trofoblas, (B) Awal penyayatan dengan orientasi ICM dan trofoblas, (C) Embrio-paruh (kembar identik) setelah penyayatan dan kultur *in vitro* selama 3 jam. Bar: 50 μ m.

embrio diatas goresan yang telah dibuat dengan harapan bisa didapatkan embrio-paruh yang sama besarnya. Pemotongan embrio tahap morula dapat dilakukan pada semua posisi, sedangkan pada embrio blastosis pemotongan harus berorientasi pada ICM dan trofoblas sehingga didapatkan embrio-paruh yang masing-masing mempunyai ICM dan trofoblas yang berkembang (Gambar 2). Embrio-paruh hasil pemotongan dicuci dalam medium kultur CR1aa untuk kemudian dikultur kembali secara *in vitro* dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 38,5°C.

Viabilitas Embrio-paruh:

Keberhasilan pemotongan embrio baik tahap morula maupun blastosis dilakukan dengan pengamatan embrio-paruh hasil pemotongan 1 jam setelah pemotongan dengan melihat morfologi embrio-paruh. Pengamatan selanjutnya untuk melihat viabilitas embrio-paruh dilakukan 24 jam setelah pemotongan pada embrio tahap morula sehingga diharapkan embrio akan berkembang mencapai tahap blastosis. Sedangkan pada pemotongan embrio tahap blastosis

pengamatan dilakukan 3 jam setelah pemotongan. Evaluasi dilakukan dengan melihat kemampuan embrio-paruh untuk membentuk kembali blastosul yang rusak akibat pemotongan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil produksi embrio kambing secara *in vitro* digunakan untuk manipulasi bedah mikro dalam upaya penggandaan embrio dengan pembuatan kembar identik. Bedah mikro dilakukan pada 81 embrio-utuh (tahap morula dan blastosis) dan dihasilkan 149 embrio-paruh dengan tingkat keberhasilan 92,0% (Tabel 1).

Tahapan embrio-utuh yang direkayasa akan menentukan keberhasilan embrio-paruh yang dihasilkan untuk tumbuh kembali setelah kultur *in vitro*. Viabilitas embrio-paruh setelah bedah mikro menunjukkan bahwa manipulasi embrio (untuk mendapatkan kembar identik) tahap blastosis didapatkan hasil yang lebih baik daripada tahap morula. Pada satu jam pengamatan setelah bedah mikro didapatkan kemampuan hidup yang lebih tinggi pada manipulasi embrio tahap blastosis (89,7%)

Tabel 1. Keberhasilan Pemotongan Embrio Kambing dengan Bedah Mikرو dan Viabilitas Embrio-paruh pada Kultur In Vitro

Tahapan embrio	Jumlah embrio-utuh	Jumlah embrio-paruh (%)	Viabilitas embrio-paruh setelah	
			1 jam (%)	3~24 jam (%)*
Morula	39	71 (91,1) ^a	49 (69,0) ^a	51 (71,8) ^a
Blastosis	42	78 (92,9) ^a	70 (89,7) ^b	73 (93,6) ^b
Total	81	149 (92,0)	119 (81,2)	124 (83,2)

Pada kolom yang sama perbedaan huruf menunjukkan perbedaan yang nyata (a-b, P<0,05)

* Pengamatan dilakukan 3 jam setelah pemotongan embrio tahap blastosis dan 24 jam setelah pemotongan embrio tahap morula.

lebih baik ($P < 0,05$) dibandingkan dengan manipulasi tahap morula (69,0%). Hal yang sama didapatkan pada pengamatan setelah 3 atau 24 jam setelah bedah mikro. Kerusakan sel yang terlalu banyak akibat bedah mikro dapat menurunkan viabilitas embrio-paruh. Tingkat keberhasilan yang lebih baik pada embrio-paruh hasil rekayasa embrio tahap blastosis dikarenakan tahapan tumbuh yang lebih baik dengan jumlah sel yang lebih banyak pada embrio tahap blastosis dibandingkan tahap morula. Selama proses pemotongan terjadi kerusakan sel secara fisik yang menyebabkan berkurangnya jumlah sel yang mampu bertahan tumbuh dan berkembang. Pada pemotongan embrio babi dilaporkan antara 31% sampai 66% jumlah sel kembali intak setelah dikultur selama 24 jam tergantung dari kualitas embrio-utuh yang dipotong (Reichelt dan Niemann, 1994). Namun demikian sebaiknya disarankan untuk seminimal mungkin terjadi kerusakan sel dalam proses manipulasi embrio. Kerusakan lebih dari 50% total sel embrio akibat manipulasi akan mengakibatkan embrio tidak mampu tumbuh dan berkembang menjadi individu normal (Heyman, 1985). Selain daripada itu, pada kambing, hambatan perkembangan morula baik embrio-utuh maupun embrio-paruh mencapai tahap blastosis masih menjadi permasalahan yang dialami oleh banyak peneliti.

Sebagai perbandingan Tsunoda *et al* (1985) mendapatkan angka keberhasilan 38% untuk kultur embrio-paruh tahap morula.

Pemotongan embrio dengan metode bedah mikro merupakan upaya secara mekanik untuk membelah embrio tahap perkembangan awal meniru kejadian kembar identik yang bisa terjadi secara alamiah. Pembuatan embrio kembar identik sangat tergantung dari keberhasilan bedah mikro dengan menghasilkan embrio-paruh dengan komposisi trofoblas dan ICM yang lengkap. Dari 124 embrio yang diperoleh dengan bedah mikro didapatkan 110 (88,7%) embrio-paruh dengan ICM dan trofoblas yang lengkap dan sebanyak 14 (11,3%) embrio-paruh tanpa ICM (Tabel 2). Hanya embrio-paruh dengan ICM dan trofoblas yang lengkap yang akan mampu berkembang menjadi individu normal. Untuk mendapatkan kembar identik, ICM sebagai sel utama mutlak harus terdapat pada masing-masing embrio-paruh hasil pemotongan. Tanpa ICM, implantasi masih memungkinkan terjadi namun fetus yang berasal dari ICM tidak akan berkembang.

Orientasi ICM pada saat bedah mikro perlu diperhatikan pada saat rekayasa menggunakan embrio tahap blastosis karena pada tahapan tersebut blastomer sudah terdeferensiasi menjadi sel utama (ICM) yang bertanggung jawab

Tabel 2. Keberhasilan Pemotongan Embrio Kambing dengan ICM sebagai Orientasi

Tahapan embrio	Embrio-paruh	Keberadaan ICM (%)	
		Positif	Negatif
Morula	51	43 (84,3) ^a	8 (15,7) ^a
Blastosis	73	67 (91,8) ^a	6 (8,2) ^a
Total	124	110 (88,7)	14 (11,3)

Pada kolom yang sama huruf yang sama tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P > 0,05$)

membentuk fetus dan sel penunjang (trofoblas) yang bertanggung jawab membentuk plasenta (Willadsen, 1979). Namun demikian bila bedah mikro untuk mendapatkan kembar identik dilakukan pada tahap morula, orientasi tersebut tidak diperlukan karena pada tahapan tersebut belum terjadi deferensiasi sel. Pemotongan embrio tahap morula relatif lebih mudah dibandingkan tahap blastosis pada embrio kambing. Hasil yang diperoleh sependapat dengan yang dilaporkan oleh Williams *et al.* (1984) dan Rho *et al.* (1998) pada pemotongan embrio sapi.

Viabilitas embrio-paruh pada kultur *in vitro* menunjukkan angka yang relatif lebih rendah pada pemotongan embrio tahap morula dibandingkan tahap blastosis, walaupun secara statistik tidak berbeda nyata. Hasil serupa juga dilaporkan oleh peneliti terdahulu (Tsunoda *et al.*, 1985; Nowshari dan Holtz, 1993) bahwa viabilitas embrio-paruh hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah dibandingkan embrio-paruh hasil pemotongan embrio tahap blastosis. Hal tersebut disebabkan oleh beberapa hal antara lain: 1) Jumlah sel embrio tahap morula lebih sedikit daripada tahap blastosis. Kerusakan fisik sebagai akibat proses pemotongan embrio akan mengakibatkan berkurangnya jumlah blastomer, 2) Hubungan antar sel yang terdapat pada embrio tahap morula lebih longgar dari pada tahap blastosis. Kemungkinan terjadi pelepasan ikatan antar blastomer pada proses pemotongan embrio tahap morula akan lebih besar dibandingkan embrio tahap blastosis, 3) Teknik pemotongan untuk menghasilkan embrio-paruh yang tidak sama besar dan beberapa hal lain yang berkaitan dengan hal tersebut. Dapat dikatakan bahwa tahap blastosis merupakan tahap yang lebih baik untuk pemotongan embrio dalam rangka produksi embrio kembar identik. Hal yang sama dilaporkan pada produksi kembar identik pada babi (Tao *et al.*, 1995), kambing (Tsunoda *et al.*, 1985) dan domba (Chesne *et al.*, 1987; Shelton, 1992).

Keberhasilan pemotongan dilihat dari morfologi embrio-paruh setelah pemotongan dengan metode yang dikembangkan dalam penelitian ini tidak berbeda bila dilakukan pada tahap morula dan blastosis. Pemotongan dilakukan secara langsung dengan memotong zona pelusida dan blastomer sekaligus dan selanjutnya dikultur secara *in vitro* tanpa zona pelusida. Pemilihan embrio tahap perkembangan morula dan blastosis untuk produksi embrio kembar identik didasarkan bahwa pada tahap tersebut embrio telah mengalami kompaksi sehingga untuk perkembangan selanjutnya dalam kondisi *in vitro* tidak diperlukan keberadaan zona pelusida (Boediono *et al.*, 1993; Boediono *et al.*, 1995).

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa teknik pemotongan embrio kambing tahap morula relatif lebih mudah daripada tahap blastosis karena orientasi yang lebih mudah. Namun demikian viabilitas embrio-paruh pada kultur *in vitro* hasil pemotongan embrio tahap morula lebih rendah daripada embrio tahap blastosis. Keberhasilan pemotongan dengan orientasi ICM didapatkan tingkat keberhasilan yang hampir sama.

UCAPAN TERIMA KASIH:

Penelitian ini dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat kontrak nomor: 011/P21PT/DPPM/20/PHB/VII/3/V/2000, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Dirjen Dikti DIKNAS.

DAFTAR PUSTAKA

Biggers, J.D. 1986. Pioneering mammalian embryo culture. In: Bavister (ed) The mammalian preimplantation Embryo. Regulation of growth and differentiation In Vitro. Plenum Press. New York. Pp 1-22.

- Boediono, A., M. Ooe, M. Yamamoto, M. Takagi, S. Saha, and T. Suzuki.** 1993. Production of chimeric calves by aggregation of *in vitro* fertilized bovine embryos without zona pellucida. *Theriogenology*, 40:1221-1230.
- Boediono, A., S. Saha, C. Sumantri, and T. Suzuki.** 1995. Development *in vitro* and *in vivo* of aggregated parthenogenetic bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7:1073-1079.
- Boediono, A., Y. Rusiyantono, K. Mohamad, I. Djuwita, dan Herliatien.** 2000. Perkembangan oosit kambing setelah maturasi, fertilisasi dan kultur *in vitro*. *Media Veteriner*, 7(4):11-17.
- Chesne, P., G. Colas, Y. Cognie, Y. Guerin, and C. Sevellec.** 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology*, 27:751-757.
- Hafez, E.S.E., and B. Hafez.** 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed. Lea&Febiger. Philadelphia. 509 pp.
- Heyman, Y.** 1985. Factors affecting the survival of whole and half-embryos transferred in cattle. *Theriogenology*, 23:63-75.
- Leibo, S.P., and W.F. Rall.** 1987. Increase in the production and pregnancy by bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 27:245 (Abstr.).
- Nowshari MA and Holtz W.** 1993. Transfer of split goat embryos without zona pellucida either fresh or after freezing. *J. Anim. Sci.*, 71:3403-3408.
- Purvis, K., and I. Egdetveit.** 1993. Factors affecting sperm yield during swimp-up. *J Assist Reprod Gen*, 10:145-150.
- Rands, G.F.** 1985. Cell allocation in half and quadruple-sized preimplantation mouse embryos. *J Exp Zool*, 236:67-70.
- Reichelt, B., and H. Niemann.** 1994. Generation of twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *J Reprod Fertil*, 100:163-172.
- Rho, G.J., W.H. Johnson, and K.J. Betteridge.** 1998. Cellular composition and viability of demi- and quarter-embryos made from bisected bovine morulae and blastocysts produced *in vitro*. *Theriogenology*, 50:885-895.
- Shelton, J.N.** 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology*, 37:713-721.
- Sreenan, J.M.** 1983. Embryo transfer procedure and its use as a research technique. *Vet Rec*, 112:494-500.
- Tao, T., B. Reichelt, and H. Niemann.** 1995. Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi- and intact pig embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 104:251-258.
- Tsunoda, Y., T. Tokunaga, T. Sugie, and M. Katsumata.** 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology*, 24:337-343.
- Van Soom, A., V. Van Vlanenderen, A.R. Mahmoudzadeh, H. Deluyker, and A. de Kruif.** 1992. Compaction rate of *in vitro* fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, 38:905-919.
- Willadsen, S.M., and R.A. Godke.** 1984. A simplified procedure for the production of identical sheep twins. *Vet. Rec.*, 114:240-243.
- Willadsen, S.M.** 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277:298-300.
- Williams, T.J., R.P. Elsdon, and G.E. Seidel Jr.** 1984. Pregnancy rate with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 22:521-531.
- Younis, A.I., K.A. Zuelke, K.M. Harper, M.A.L. Oliveira, and B.G. Brackett.** 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod*. 44:1177-1182.