

PRODUKSI KHIMERA MENCIT DENGAN METODE AGREGASI EMBRIO
PRODUCTION OF CHIMERIC MICE BY AGGREGATION EMBRYOS METHOD

Rosadi, B.¹⁾, A. Boediono²⁾, K. Mohamad²⁾, S. Agungpriyono²⁾ dan Y. Sukra²⁾

¹⁾ Fakultas Peternakan Universitas Jambi

²⁾ Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor

ABSTRACT

The objective of this experiment was to study the developmental competence of single and aggregated embryos *in vitro* and phenotypic aspects of chimeric mice. Chimeric embryos were produced by aggregation of 8-cell stage embryos from two strains of mice that have different coat coloration (white and brown). Zona pellucida were removed using 0.25% pronase and aggregation was done by physically micro-manipulation. The aggregation rate between combination of white mice embryos (W:W) and white mice embryos and brown mice embryos (W:B) (56/64, 87.5% and 41/46, 89.1% for W:W and W:B). Zona removal and aggregation did not affect ($P>0.05$) the development competence of embryos cultured *in vitro* up to expanded blastocyst stage. The development rate embryo up to expanded blastocyst of single embryo with zona, without zona and aggregated two embryos was not different ($P>0.05$) among the treatment (64/74, 86.5%; 24/32, 75.0% and 39/54, 72.2% for single embryo with zona, without zona and aggregated two embryos, respectively). Twenty four aggregated embryos (W:B) were transferred to pseudopregnant recipient, two chimeric mice were born phenotypically white color with brown spotted (male and female). Biological tested showed that both female and male chimeric produced mice were fertil. These results concluded that chimeric mice could be produced by aggregation of 8-cell stage embryos and cultured *in vitro* without zona pellucida. The development competence of embryo *in vitro* was not affected by zona removal and aggregation.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari kapasitas perkembangan embrio tunggal dan agregat embrio *in vitro* serta aspek fenotip dari mencit khimera. Embrio khimera diproduksi dengan metode agregasi embrio tahap 8-sel dari dua strain mencit dengan warna rambut yang berbeda (putih dan coklat). Zona pelusida dihilangkan menggunakan enzim pronase 0,25% dan agregasi dilakukan secara manipulasi mikro. Keberhasilan agregasi tidak berbeda nyata ($P>0,05$) antara dua embrio mencit putih (P:P) dan embrio mencit putih dengan mencit coklat (P:C) (56/64, 87,5% dan untuk P:P dan P:C 41/46, 89,1%). Penghilangan zona dan agregasi tidak mempengaruhi ($P>0,05$) kapasitas perkembangan embrio *in vitro* yang dikultur sampai tahap blastosis. Persentase blastosis ekspan tidak berbeda ($P>0,05$) antara embrio tunggal dengan zona, tunggal tanpa zona dan agregat dua embrio, masing-masing (64/74, 86,5%; 24/32, 75,0% dan 39/54, 72,2%). Dua puluh empat agregat dua embrio (P:C) ditransfer ke betina resipien, dua khimera lahir belang putih-coklat dengan jenis kelamin jantan dan betina. Hasil uji biologis perkawinan alami dengan mencit putih atau coklat menunjukkan kedua mencit khimera tersebut fertil. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa khimera mencit dapat diproduksi dengan agregasi embrio tahap 8-sel yang dikultur *in vitro* tanpa zona pelusida. Perkembangan embrio *in vitro* tidak dipengaruhi oleh penghilangan zona dan agregasi.

PENDAHULUAN

Berbagai macam metode digunakan dalam penelitian biologi perkembangan. Salah satu teknik yang digunakan adalah pembuatan hewan khimera. Di dalam individu khimera terdapat dua macam atau lebih populasi sel yang memiliki kandungan material genetik yang berbeda. Khimera berguna untuk mempelajari jalur perkembangan sel pada embrio yang sedang tumbuh (West *disitasi* Piedrahita *et al.*, 1992), determinasi seks (Mc Laren, 1975), interaksi sel (Papaiannou *disitasi* Piedrahita *et al.*, 1992) dan menyelamatkan hewan dari kemungkinan fenotip letal (Surani *et al.*, 1977; Stevens, 1978; Boediono *et al.*, 1999).

Khimera dapat diproduksi dengan menambahkan populasi sel ke dalam embrio pada berbagai tahap perkembangan dini (Hogan *et al.*, 1986; Polzin *et al.*, 1987) atau agregasi pada tahap cleavage lebih awal (Mintz *et al. dalam* Gilbert, 1988; Piedrahita *et al.*, 1992; Boediono *et al.*, 1995). Pada hewan mamalia tertentu khimera dapat diproduksi dengan tranplantasi bagian embrio tahap lanjut dengan terminasi yang sudah diketahui ke individu lain yang berbeda spesies (Gilbert, 1988).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa agregat embrio khimera memiliki kelebihan dibandingkan embrio tunggal. Dengan memanfaatkan sifat interaktif antar sel-sel blastomer, teknik agregasi dapat meningkatkan viabilitas embrio partenogenetik *in vitro* dan *in utero* sehingga sel-selnya dapat terdistribusi pada khimera yang lahir (Stevens, 1978; Fundele *et al.*, 1991; Boediono *et al.*, 1999) meskipun kontribusi sel-sel partenogenon kurang dari 20% dari total populasi sel (Surani *et al.*, 1977). Khimera yang terbentuk melalui teknik ini juga memungkinkan mendapatkan *sex ratio* yang lebih besar jantan; pada mencit 15% khimera XX-XY tumbuh menjadi betina, 6% intersex dan 80% jantan (Mullen dan Whitten, 1971; Mc Laren, 1975).

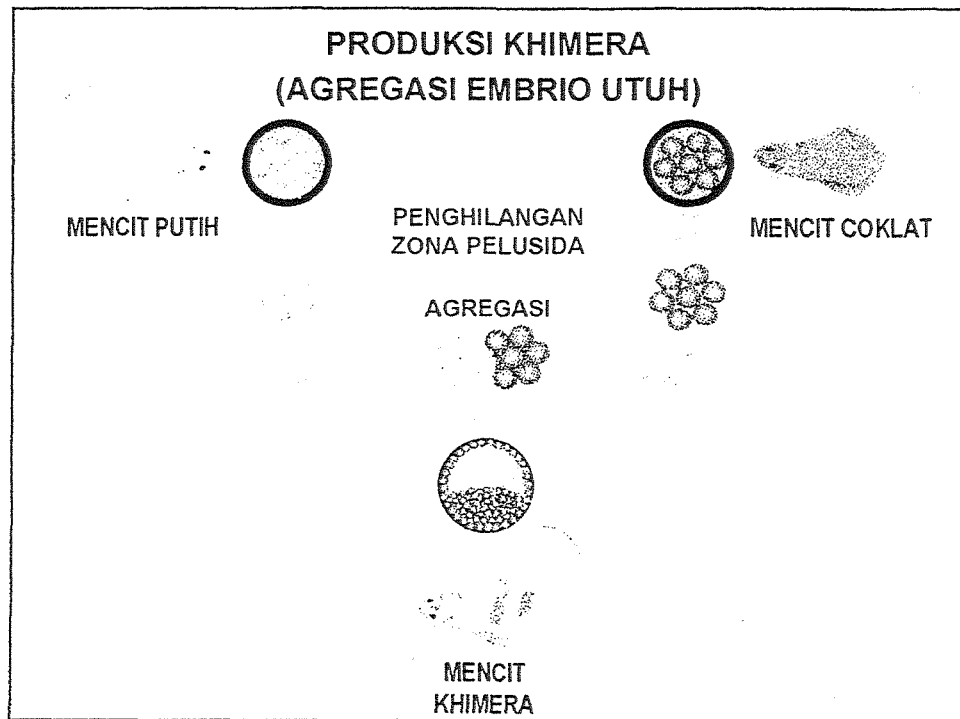
Beberapa aspek agregat embrio yang merupakan tahapan produksi hewan khimera perlu ditelaah. Untuk mendapatkan gambaran yang lebih jelas tentang karakteristik agregat embrio khimera diperlukan penelitian khususnya yang difokuskan pada kapasitas perkembangan dan fenotip yang muncul. Penelitian ini bertujuan mempelajari kapasitas perkembangan *in vitro* embrio khimera diproduksi dengan teknik agregasi embrio penuh tahap 8-sel serta fenotip yang muncul.

BAHAN DAN METODE

Embrio dikoleksi dari mencit putih dan mencit dengan fenotip warna coklat. Mencit berumur 2-3 bulan disuperovulasi dengan penyuntikan 5 IU PMSG (*pregnant mare's serum gonadotrophine*, Folligon, Intervet, New Zealand) diikuti injeksi 5 IU hCG (*human chorionic gonadotrophine*, Chorulon, Intervet, New Zealand) intraperitoneum 48 jam berikutnya. Mencit yang sudah diprogram dikawinkan dengan jantan dari strain yang sama setelah penyuntikan hCG. Keberhasilan perkawinan diamati dengan pemeriksaan sumbat vagina pada keesokan harinya. Embrio tahap 8-sel dikoleksi dengan cara seksi pada tuba falopii menggunakan spuit 26G dalam medium M2 disuplementasi 2 mg/ml BSA (*bovine serum albumin*, Gibco, USA) pada suhu 37°C.

Embrio hasil koleksi dicuci dengan medium M2 (Hogan *et al.*, 1986) dan dilakukan evaluasi. Hanya embrio tahap 8-sel yang digunakan untuk agregasi. Metode agregasi dilakukan dengan menggabungkan dua embrio setelah zona pelusida dihilangkan (Gambar 1). Penghilangan zona dilakukan dengan menempatkan embrio dalam medium M2 mengandung 0,25% pronase (Sigma, USA) selama 2-4 menit. Embrio tanpa zona dicuci tiga kali dalam medium CZB (Chatot *et al.*, 1989) yang telah disuplementasi 3 mg/ml BSA dan 5,56 mM glukosa. Agregasi dilakukan dalam drop (10 µl medium CZB) dengan cara mendekatkan embrio satu sama lain secara manipulasi mikro. Setiap drop hanya berisi satu agregat, kombinasi antara embrio mencit putih : embrio mencit putih (P:P) dan embrio mencit putih : embrio mencit coklat (P:C). Embrio agregat dikultur lebih lanjut pada suhu 37°C dengan kondisi udara 5% CO₂, 5% O₂ dan 90% N₂ selama 48 jam. Reagregasi dilakukan empat jam setelah agregasi bila didapatkan pasangan embrio yang tidak teragregasi. Perkembangan embrio pada kultur *in vitro* diamati dengan interval waktu 24 jam.

Agregat embrio yang mencapai tahap blastosis ditransfer ke betina pseudopregnant pada hari ke-4 kebuntingan (Johnson *et al.*, 1996). Betina pseudopregnant diperoleh dengan mengawinkan betina satu hari setelah betina donor dikawinkan menggunakan jantan yang telah divasektomi. Betina yang positif kawin (ditandai adanya sumbat vagina) digunakan sebagai resipien.



Gambar 1. Metode agregasi embrio mencit putih dan embrio mencit coklat pada produksi khimera

Dalam penelitian ini evaluasi dilakukan dengan pengamatan terhadap: a) perolehan embrio hasil superovulasi, b) keberhasilan agregasi, c) keberhasilan perkembangan embrio pada kultur *in vitro*, dan d) penampilan eksterior dari khimera yang dihasilkan.

Data perkembangan embrio dan agregat embrio sampai tahap blastosis dianalisis dengan uji khi-kuadrat. Hasil panen embrio, keberhasilan agregasi dan komposisi fenotip dianalisis menggunakan uji t (Student). Data disajikan dalam bentuk rata-rata \pm standar deviasi (Steel dan Torrie, 1991).

HASIL DAN PEMBAHASAN

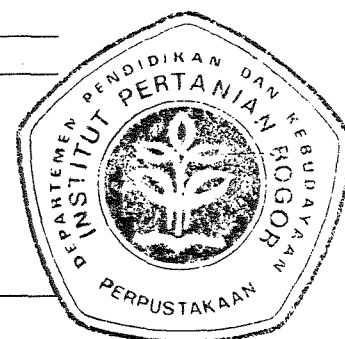
Pemanenan embrio pada awal hari ketiga setelah fertilisasi dimaksudkan untuk mendapatkan embrio tahap 8-sel yang dianggap paling baik untuk dilakukan agregasi (Mullen dan Whitten, 1971). Waktu pemanenan tersebut disesuaikan tahapan perkembangan embrio *in vivo* (Hogan *et al.*, 1986).

Hasil panen pada Tabel 1 menunjukkan bahwa pada kedua strain yang dipanen pada hari ke-3 sebagian besar perolehan embrio berada pada tahap perkembangan 8-sel. Rataan jumlah embrio yang diperoleh tiap ekor betina tidak menunjukkan perbedaan yang nyata

antara keduanya ($P < 0,05$) meskipun mencit putih sedikit lebih banyak menghasilkan embrio. Hal ini menunjukkan responsifitas terhadap superovulasi relatif sama, walaupun untuk berbagai strain mencit memberikan respon yang bervariasi terhadap superovulasi (Hogan *et al.*, 1986).

Tabel 1. Hasil Panen Embrio Hari ke-3 Setelah Fertilisasi

Tahap perkembangan	Jumlah embrio (%)	
	Mencit Coklat	Mencit Putih
1-sel	16 (4,73)	27 (4,96)
2-sel	23 (6,80)	23 (4,23)
3-4 sel	49 (14,50)	77 (14,15)
8-sel	178 (52,66)	320 (58,82)
Morulla	45 (17,37)	62 (11,39)
Degenerasi	27 (11,60)	35 (6,43)
Total	338 (100)	544 (100)
Jumlah mencit	14	19
Rataan	24,14±7,94	28,63±8,57



Sebagian embrio yang dipanen berada pada tahap perkembangan 1-sel, 2-sel, 3-4 sel, dan morula. Munculnya embrio tahap perkembangan 1-sel, 2-sel dan degenerasi kemungkinan disebabkan oleh kualitas yang berbeda pada oosit yang diovasikan. Oosit berkualitas rendah menurunkan potensi perkembangan pada tahap yang dikendalikan oleh faktor induk betina.

Embrio 4-sel, 8-sel dan morula kompak berbeda tahap perkembangan karena dua kemungkinan. Pertama, waktu ovulasi dan fertilisasi yang tidak sama. Ovulasi pada mencit tidak terjadi serentak tetapi keseluruhan oosit matang diovasikan dalam tenggang waktu 12-14 jam setelah injeksi hCG. Fertilisasi juga tidak bersamaan sehingga sebagian embrio berkembang dimulai pada saat yang berbeda-beda. Kedua, faktor intrinsik berupa viabilitas inheren pada masing-masing individu oosit (Gardner, 1998) yang tidak sama tercermin dari perbedaan kecepatan perkembangan embrio.

Agregasi embrio dilakukan antar embrio pada tahap 8-sel. Pemilihan tahap ini sebagai partner agregat didasarkan pada sifat fisiologis sel-sel blastomernya menjelang terjadinya proses pengompakan morula. Perkembangan blastomer sampai tahap 8-sel membentuk konfigurasi antar blastomer yang longgar, banyak ruang diantaranya. Setelah cleavage ketiga, blastomer mengalami perubahan dramatis dalam perilakunya (Gilbert, 1988). Flatening blastomer terhadap lainnya pada proses pengompakan diakibatkan

pemendekan mikrovili melalui depolimerisasi aktin memaksimalkan kontak antar blastomer membentuk bola kompak dari sel-sel (Pratt *et al.*, 1987).

Dengan memanfaatkan fenomena ini, embrio yang akan diagregasikan didekatkan satu sama lain secara manipulasi mikro setelah dihilangkannya zona pelusida. Blastomer dari embrio berbeda yang berdekatan akan membentuk ikatan yang kuat lalu bersama-sama membentuk morula kompak. Berikutnya blastomer dari dua embrio dengan asal berbeda berkesempatan untuk mengalami diferensiasi menjadi trophoctoderm atau ICM dari blastosis khimera yang terbentuk.

Dalam penelitian ini keberhasilan agregasi cukup tinggi (Tabel 2). Penggunaan embrio tahap 8 sel yang belum kompak memberikan peluang yang besar untuk terjadinya agregasi. Kegagalan embrio membentuk agregat dimungkinkan karena pengaruh ekspos embrio ke medium yang mengandung enzim pronase atau karena gangguan mekanis selama penanganan embrio pada saat agregasi dan kultur. Blastomer yang berada di bagian terluar yang bersinggungan dengan zona pelusida dapat mengalami kerusakan ketika penghilangan zona.

Tabel 2. Keberhasilan agregasi embrio tahap-8 sel

Kombinasi embrio	Jumlah Agregasi	Agregat Terbentuk	Keberhasilan agregasi (%)
P : P	64	56	83,53
P : C	46	41	87,88

Keterangan: P= embrio mencit putih; C= embrio mencit coklat

Penghilangan zona pelusida dengan metode pronase dalam upaya produksi khimera dilaporkan peneliti sebelumnya pada mencit (Mullen dan Whitten, 1971), hamster (Piedrahita *et al.*, 1992). Sedangkan penghilangan zona dengan teknik bedah mikro dilaporkan pada sapi oleh Boediono *et al.* (1993).

Selama periode perkembangan, embrio mengalami perubahan dinamis termasuk morfologi, fisiologi dan biokimiawi (Gardner, 1998). Beberapa jam setelah tahap 8-sel, embrio tunggal maupun agregat embrio mencapai tahap morula kompak setelah mengalami proses pengompakan. Aksi osmotik kemudian menyebabkan aliran cairan ke bagian interior morula menimbulkan ekspansi embrio karena tekanan hidrostatis (Gilbert, 1988). Akumulasi cairan ini akan membentuk rongga blastosol dan embrio mencapai tahap blastosis. Secara *in vivo* embrio mulai membentuk blastosol 94 jam setelah hCG. Blastosis akan terus ekspansi karena sel-sel komponennya menuju dua siklus berikutnya.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata ($P>0,05$) dalam perkembangan embrio tunggal dengan zona, tunggal tanpa zona serta agregat embrio (Tabel 3). Walaupun demikian embrio dengan zona yang digunakan sebagai kontrol dalam penelitian ini memiliki kapasitas perkembangan yang sedikit lebih tinggi dibandingkan embrio tanpa zona. Berbeda dengan hasil pada mencit ini, ekspos embrio sapi kedalam medium yang mengandung enzim pronase secara nyata menurunkan kapasitas perkembangan embrio (Boediono *et al.*, 1993).

Tabel 3. Perkembangan embrio setelah agregasi (48 jam kultur dalam medium CZB)

Embrio	Jumlah	Tahap Perkembangan (%)			
		Morula kompak	Blastosis awal	Blastosis	Blastosis ekspan
Tunggal dengan zona	74	74 (100)	73 (98,65)	72 (97,30)	64 (86,49)
Tunggal tanpa zona	32	32 (100)	29 (90,65)	27 (84,38)	24 (75,00)
Agregat	54	54 (100)	49 (90,74)	48 (88,89)	39 (72,22)

Dari 24 embrio khimera hasil gabungan satu embrio mencit coklat dengan satu embrio mencit putih yang ditransfer diperoleh dua ekor khimera mencit yang lahir. Pengamatan dilakukan secara makroskopis pada penampakan eksterior yaitu warna rambut dan organ kelamin luar. Seekor diantara khimera yang lahir berfenotip jantan, bagian testis jelas dan tampak normal. Perbandingan luasan warna rambut antara putih dengan coklat sekitar 65:35. Seekor lainnya berkelamin luar betina didominasi warna putih dan perbandingan luasan warna rambut putih dengan coklat 85:15.

Uji biologis pada khimera mencit jantan dilakukan dengan mengawinkan secara alamiah menggunakan betina normal baik yang putih maupun yang coklat. Betina pasangan yang digunakan dalam pengujian ini berhasil bunting. Khimera mencit betina dapat bunting setelah dikawinkan dengan jantan coklat. Dengan demikian kedua khimera yang dihasilkan bersifat fertil.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa khimera mencit dapat diproduksi dengan metode agregasi embrio tahap 8-sel. Embrio tanpa zona dapat tumbuh sampai tahap blastosis dengan kapasitas perkembangan yang sama dengan embrio

yang memiliki zona. Agregasi embrio tidak mempengaruhi perkembangan *in vitro* sampai mencapai tahap blastosis.

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut yang lebih komprehensif mengenai perkembangan embrio agregat khimera *in vivo* dan aspek genetik serta fenotip dari khimera yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- 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 zonae pelucidae. *Theriogenology* 40 : 2221- 230.
- 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., T. Suzuki, L.Y. Li and R.A. Godke. 1999. Offspring born from chimeras reconstructed from parthenogenetic and *in vitro* fertilized bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 53 : 159-170.
- Chatot, C.L., C.A. Ziomek, B.D. Bavister, J.L. Lewis and I. Torres. 1989. An Improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *Reprod. Fert.* 86 : 679-688.
- Fundele, R.H., S.K. Howlett, R. Kothary, M.L. Norris, W.E. Mills and M.A.H. Surani. 1991. Developmental potential of parthenogenetic cells: role of genotype-specific modifiers. *Development* 105 : 115-118.
- Gardner, D.K. 1998. Change in requirement and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 49 : 83-102.
- Gilbert, S.F. 1988. *Developmental Biology*. Second edition. Sinauer Associates Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts.
- Hogan, B, F. Constantini and E. Lacy. 1986. *Manipulating Mouse Embryos, a Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Johnson, L.W., R.J. Moffat, F.F. Bartol, and C.A. Pinkert. 1996. Optimazation of embryo transfer protocol for mice. *Theriogenology* 46 : 1267-1276.
- Mc Laren, A. 1975. Sex chimaerism and germ cell distribution in a series of chimaeric mice. *Embryol. Exp. Morphol.* 33: 205-216.
- Mullen, R.J. and W.K. Whitten. 1971. Relationship of genotype and degree of chimerism in coat color to sex ratio and gametogenesis in chimeric mice. *Exp. Zool.* 178 : 165-176.

- Piedrahita, J.A, L. Gillespie and N Maeda. 1992. Production of chimeric hamsters by aggregation of eight-cell embryos. *Biol. Reprod.* 47 : 347- 354.
- Polzin, V.J., D.L. Anderson, G.B. Anderson, R.H Bond Dunant, J.E. Butler, R.L. Pasher, M.W. Renedo and J.D. Rorui. 1987. Production of sheep-goat chimeras by inner cell mass transplantation. *Anim. Sci.* 65 : 325-330.
- Pratt, H.P.M. 1987. Isolation, culture and manipulation of pre-implantation mouse embryos. In : Monk. 1987. *Mammalian Development, A Practical Approach*. IRC Press, Oxford, Washington.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1991. *Prinsip dan Prosedur Statistika*. Edisi Kedua. Terjemahan: B. Sumantri. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Stevens, C.L. 1978. Totipotent cells of parthenogenetic origin in a chimaeric mouse. *Nature* 276: 266-267.
- Surani, M.A.H, S.C. Barton and M.H. Kaufman. 1977. Development to term of chimeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature* 270 : 601-602.