

ABNORMALITAS JUMLAH KROMOSOM EMBRIO TAHAP BLASTOSIS PADA MENCIT DAN MANUSIA

THE INCIDENCE OF NUMERICAL CHROMOSOME ANOMALIES IN MOUSE AND HUMAN BLASTOCYSTS

Pristiani N Notoesoediro, Kusdiantoro Mohamad, dan Arief Boediono

Laboratorim Embriologi, Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor,
Jalan Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16880 INDONESIA, E-mail: ab@bogor.wasantara.nct.id

ABSTRAK

Media Veteriner. 2001. 3(62-65).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kejadian abnormalitas jumlah kromosom pada embrio mencit dan manusia tahap blastosis. Embrio mencit diperoleh setelah superovulasi, pada hari keempat kebuntingan (H-4) pada saat embrio telah mencapai tahap blastosis. Embrio manusia yang dianalisa merupakan donasi dari salah satu klinik infertilitas dan embrio yang digunakan merupakan kelebihan embrio setelah dilakukan transfer dan ibu dinyatakan hamil sampai mempunyai anak. Dari hasil observasi diperoleh jumlah sel rata-rata blastosis mencit sebesar 63,94 dan pada blastosis manusia diperoleh sebesar 86,38. Jumlah rata-rata metafase pada blastosis mencit yang diamati adalah 10,81 dan sebesar 13,88 pada blastosis manusia. Dari hasil tersebut maka diperoleh indeks mitotik sebesar 17,27 pada blastosis mencit dan 13,88 pada blastosis manusia. Dari 16 embrio mencit, teranalisa sebanyak 10 embrio (62,50%) dan pada embrio manusia teranalisa 8 dari 13 embrio yang diperoleh (61,54%). Abnormalitas jumlah kromosom blastosis mencit adalah embrio N/2N sebesar 30,00%. Pada blastosis manusia, teranalisa abnormalitas jumlah kromosom dengan variasi N/2N, 2N/4N, embrio mosaik (2N/3N/4N) dan embrio tetraploidi (4N) dengan persentase yang sama yaitu 12,50%. Hasil yang diperoleh memperlihatkan bahwa analisa kromosom merupakan salah satu metode yang penting untuk mendeteksi adanya abnormalitas kromosom guna menghindari transfer embrio yang berkualitas rendah yang dapat mengakibatkan terlahirnya individu cacat atau mengidap penyakit tertentu. Selain itu, kondisi dan lamanya waktu kultur dapat menyebabkan meningkatnya insidensi abnormalitas kromosom pada embrio yang dihasilkan.

Kata-kata kunci: kromosom, blastosis, mencit, manusia

ABSTRACT

Media Veteriner. 2001. 33(62-65).

The research has been conducted to examine the incidence of numerical chromosome anomalies in mouse and human blastocysts. Mouse embryos were collected from superovulated mouse on day 4 of pregnancy. Human embryos examined were donation from one of infertility clinic that the patient (mother) was already conceive or born

a child. The mean number of cell in mouse blastocyst was 63.94 and 86.38 in human blastocyst. The mean number of metaphase plate in mouse blastocyst was 10.81 and 13.88 in human blastocyst. The mitotic index of mouse blastocyst was 17.27 and 13.88 in human blastocyst. Chromosomal anomalies were observed in 62.50% (10/16) and 61.54% (8/13) of mouse and human embryos, respectively. Among those with anomalies, 3 (30.00%) were N/2N in mouse embryos. In human embryos, 1 (12.50%) was N/2N, 1 (12.50%) was 2N/4N, 1 (12.50%) was 2N/3N/4N mosaic, and 1 (12.50%) was tetraploidy/4N. These results show that chromosome analysis is very important as a tool to prevent transferring the low quality embryos, which can cause any defects to the offspring. The duration and condition of in vitro culture could affect the growth rate of embryos and increase the incidence of numerical chromosome anomalies.

Key words: chromosome, blastocysts, mouse, human

PENDAHULUAN

Perkembangan teknologi reproduksi berjalan seiring dengan upaya peningkatan populasi dan mutu genetika. Program Inseminasi Buatan (Artificial Insemination), transfer embrio dan produksi embrio *in vitro* mulai banyak dikembangkan dalam rangka untuk meningkatkan produktifitas serta kualitas keturunan yang dihasilkan. Pada manusia, program bayi tabung merupakan salah satu usaha yang dilakukan untuk mengatasi masalah infertilitas.

Keberhasilan penerapan teknologi-teknologi tersebut tergantung oleh beberapa hal. Salah satu yang sangat berperan adalah komposisi kromosom pada embrio yang dihasilkan. Oleh sebab itu, analisa kromosom merupakan salah satu metode yang dapat digunakan untuk menunjang program-program tersebut. Melalui analisa kromosom, kelainan genetika ataupun penyakit yang akan diderita oleh suatu individu dapat dideteksi sejak dini sehingga efek klinis maupun biologis yang akan ditimbulkannya dapat dihindari. Analisa kromosom dapat dilakukan dengan cara menghitung jumlahnya ataupun dengan melihat struktur dari kromosom tersebut.

Mencit sebagai salah satu mamalia terkecil merupakan hewan model yang baik sebagai langkah awal dilakukannya analisa genetika pada mamalia lainnya. Pada akhirnya, hal ini akan memberikan kontribusi yang cukup besar bagi kesejahteraan manusia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kejadian abnormalitas jumlah kromosom

embrio mencit hasil produksi *in vivo* dan embrio manusia hasil fertilisasi *in vitro* (IVF) pada tahap blastosis.

BAHAN DAN METODE

1. Koleksi Embrio

Prosedur superovulasi dan koleksi embrio mencit dilakukan sesuai dengan metode yang dilaporkan terdahulu oleh Mohamad *et al.* (1999) dengan sedikit modifikasi. Mencit betina disupercovulasi dengan penyuntikan PMSG dan hCG dengan interval waktu 48 jam dan dengan dosis masing-masing sebesar 5 IU/ekor secara intra peritoneal. Segera setelah penyuntikan hCG, mencit betina dikawinkan dengan pejantan dari strain yang sama dengan sistem monogami dimana perbandingan jantan : betina = 1 : 1. Keesokan paginya, mencit betina diperiksa terhadap ada tidaknya sumbat vagina (*vaginal plug*) yang menandakan bahwa mencit telah melakukan perkawinan. Hari ditemukannya sumbat vagina ditetapkan sebagai hari pertama kebuntingan (H-1).

Embrio mencit yang digunakan dikoleksi pada hari keempat kebuntingan (H-4) dengan jalan membilas kornua uteri menggunakan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS; Gibco, USA). Embrio manusia yang dianalisa merupakan donasi dari salah satu klinik infertilitas, dimana embrio yang digunakan merupakan kelebihan embrio setelah dilakukan transfer dan ibu dinyatakan hamil sampai mempunyai anak.

2. Pembuatan Preparat Kromosom

Prosedur perhitungan jumlah sel dan komposisi kromosom dilakukan seperti metode yang telah dilaporkan oleh Boediono *et al.* (1995) dengan sedikit modifikasi. Blastosis yang diperoleh dikultur dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37°C di dalam medium kultur yang mengandung 0,04 µg/ml *colcemid* (Sigma, USA) yang telah diekuilibrasikan dalam inkubator CO₂ 5% minimal selama 30 menit. Media kultur yang digunakan terdiri dari TCM 199 (Sigma, USA) ditambahkan dengan 5% *fetal bovine serum* (FBS, Gibco, USA) dan 50 µg/ml *gentamycin* (Gibco, USA).

Tahap selanjutnya adalah dilakukan perendaman embrio dalam larutan hipotonik selama 5 menit. Larutan hipotonik terdiri dari 0,09 g *Tri-sodium citrate* (Sigma, USA) yang ditambahkan dengan 5% serum dalam *deionized water* (DW). Proses ini akan mengakibatkan blastomer membengkak (*swelling*) yang pada akhirnya akan menentukan kualitas penyebaran metafase dalam pembuatan preparat (Iwasaki *et al.* 1989). Setelah tahap ini kemudian dilakukan fiksasi embrio. Fiksasi dilakukan melalui 3 tahap dengan jenis fiksatif yang berbeda. Fiksatif I terdiri dari campuran larutan hipotonik dan larutan Carnoy (metanol : asam asetat : DW = 3 : 2 : 1). Kemudian dilanjutkan perendaman embrio pada larutan Carnoy (fiksatif II). Fiksatif yang terakhir (fiksatif III) berupa asam asetat glasial. Embrio yang berasal dari fiksatif II, diambil dengan sesedikit mungkin larutan Carnoy dan selanjutnya diletakkan di atas gelas obyek. Sambil ditiup, ditetaskan fiksatif III. Kemudian embrio pada gelas obyek dibiarkan

mengering selama satu malam dan diwarnai dengan giemsa 5% dengan pH 6,8 selama 20 menit.

3. Evaluasi

Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 100 X untuk menghitung jumlah sel (blastomer) dan blastomer yang berada pada tahap metafase serta dengan pembesaran 400 X untuk menghitung jumlah kromosom.

Pada preparat kromosom, dapat dihitung jumlah blastomer yang terdiri dari blastomer intak ditambah dengan blastomer yang berada pada tahap metafase. Sedangkan perhitungan jumlah kromosom dilakukan pada blastomer yang berada pada tahap metafase. Hasil evaluasi dikategorikan menjadi:

- Diploidi (2N/Normal), apabila kromosomnya berjumlah 20 pasang atau 40 buah untuk mencit dan 23 pasang atau 46 buah untuk manusia.
- Haploidi (N), apabila embrio tersebut hanya memiliki satu set kromosom yaitu 20 buah untuk mencit dan 23 buah untuk manusia.
- Triploidi (3N), apabila embrio memiliki 3 set kromosom yaitu 30 pasang atau 60 buah untuk mencit dan 69 buah untuk manusia.
- Tetraploidi (4N), apabila embrio memiliki 4 set kromosom yaitu 40 pasang atau 80 buah untuk mencit dan 46 pasang atau 92 buah pada manusia.
- Mosaik, apabila ditemukan variasi jumlah kromosom berupa 2N, 3N dan 4N pada sel-sel embrio yang berasal dari embrio yang sama.

Indeks mitotik merupakan nilai yang diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah blastomer yang berada pada tahap metafase dengan jumlah blastomer keseluruhan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada Tabel 1. dapat dilihat bahwa jumlah blastomer rata-rata blastosis mencit adalah 63,94 (49~108) dan pada blastosis manusia diperoleh sebesar 86,38 (50~144). Rosadi *et al.* (2001) mendapatkan jumlah rata-rata blastomer mencit sebesar 73,85. Jumlah rata-rata metafase blastosis mencit yang diamati adalah 10,81 (1~27) dan sebesar 11,31 (3~21) pada blastosis manusia. Dari hasil tersebut, maka diperoleh rata-rata indeks mitotik sebesar 17,27 pada blastosis mencit dan sebesar 13,88 pada blastosis manusia. Angka ini menunjukkan tingkat keberhasilan penghambatan perkembangan embrio pada tahap metafase.

Abnormalitas kromosom dibagi menjadi dua golongan besar yaitu 1) perubahan dalam jumlah kromosom dan 2) perubahan dalam struktur kromosom. Pada penelitian ini abnormalitas kromosom hanya diamati berdasarkan perubahan dalam hal jumlah kromosom. Dari 16 embrio mencit, teranalisa sebanyak 10 embrio (62,50%) dan pada embrio manusia teranalisa 8 dari 13 embrio yang diperoleh (61,54%) (Tabel 2).

Tabel 1. Jumlah rata-rata blastomer, metafase dan indeks mitotik blastosis mencit dan manusia

Blastosis	Jumlah Embrio	Jumlah Blastomer	Jumlah Metafase	Indeks Mitotik (%)
Mencit	16	63,94 ± 15,68 (49 ~ 108)	10,81 ± 7,78 (1 ~ 27)	17,27 ± 13,81
Manusia	13	86,38 ± 27,94 (50 ~ 144)	11,31 ± 5,09 (3 ~ 21)	13,88 ± 5,99

Tabel 2. Komposisi kromosom blastosis mencit dan manusia

Blastosis	Jumlah Embrio			Komposisi Kromosom (%)				
	Diamati	Normal	Abnormal	Normal (2N)	Abnormal (N/2N)	Abnormal (2N/4N)	Abnormal (2N/3N/4N)	Abnormal (4N)
Mencit	10	7	3	7 (70,00)	3 (30,00)	-	-	-
Manusia	8	4	4	4 (50,00)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)	1 (12,50)

Abnormalitas kromosom dibagi menjadi dua golongan besar yaitu 1) perubahan dalam jumlah kromosom dan 2) perubahan dalam struktur kromosom. Pada penelitian ini abnormalitas kromosom hanya diamati berdasarkan perubahan dalam hal jumlah kromosom. Dari 16 embrio mencit, teranalisa sebanyak 10 embrio (62,50%) dan pada embrio manusia teranalisa 8 dari 13 embrio yang diperoleh (61,54%) (Tabel 2).

Jumlah metafase yang teranalisa pada blastosis mencit adalah 61,86% (73/118) sedangkan pada blastosis manusia yang diamati, jumlah metafase yang teranalisa adalah sebesar 54,55% (54/99). Abnormalitas jumlah kromosom yang terjadi pada blastosis mencit hasil pengamatan adalah N/2N yaitu sebesar 30,00% (3/10) sedangkan pada blastosis manusia terdapat variasi abnormalitas jumlah kromosom berupa embrio aneuploidi (N/2N), embrio 2N/4N, embrio mosaik (2N/3N/4N) serta embrio tetraploidi (4N) masing-masing sebesar 12,50%.

Abnormalitas jumlah kromosom dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti umur induk (Long dan Williams, 1980), superovulasi (Van der Auwera dan D'Hooghe, 2001), fertilisasi *in vitro* (Kasai *et al.*, 1981), pembekuan (Glenister *et al.*, 1987; Laverge *et al.*, 1998), waktu fertilisasi (Sukra, 2000), dan kondisi kultur yang sub optimal (Bird dan Forrester 1981). Tingginya abnormalitas jumlah kromosom manusia yang dianalisa dapat disebabkan oleh waktu kultur yang cukup lama, mengingat embrio manusia tersebut merupakan hasil dari fertilisasi *in vitro* (IVF). Kesalahan-kesalahan baik dalam mitosis maupun meiosis, seperti *non disjunction* dapat mengakibatkan abnormalitas jumlah kromosom (Nicholas, 1987). Peristiwa tersebut dapat terjadi baik pada kromosom tubuh (autosom) ataupun pada kromosom kelamin (gonosom).

Peristiwa *non disjunction* dapat terjadi selama mitosis yang dapat dimulai pada tahap awal perkembangan embrio.

Individu mosaik merupakan salah satu kasus yang terjadi akibat *non disjunction* pada masa pertengahan perkembangan embrio dan dilambangkan dengan

2N/3N/4N. Jika *non disjunction* terjadi pada awal perkembangan embrio, maka abnormalitas komposisi kromosom terjadi hampir menyeluruh.

Selain peristiwa *non disjunction*, peristiwa lain yang dapat menyebabkan abnormalitas jumlah kromosom diantaranya adalah proses pembuahan. Pembuahan sel telur yang abnormal seperti polispermia (pembuahan sel telur oleh lebih dari satu spermatozoa) merupakan kausa utama terbentuknya individu poliploidi (mengandung lebih dari dua set kromosom) (Iwasaki *et al.*, 1989). Abnormalitas jumlah kromosom seperti ini seringkali terjadi pada proses fertilisasi *in vitro* (IVF).

Abnormalitas komposisi kromosom pada mamalia mempunyai berbagai dampak yang dapat bersifat merugikan. Dampak yang dinilai sangat penting bagi dunia reproduksi terhadap jumlah kromosom yang abnormal adalah kontribusinya dalam menurunkan penampilan reproduksi dengan 1) menunjukkan penurunan kemampuan bahkan kegagalan dalam memproduksi sel kelamin (gamet) yang fungsional atau 2) menyebabkan kematian embrio. Jumlah kromosom yang abnormal pada embrio mamalia merupakan salah satu penyebab kegagalan proses implantasi di dalam uterus induk atau akan menghambat proses perkembangan embrio. Peristiwa ini telah dilaporkan pada sapi oleh Iwasaki *et al.* (1990). Pada manusia, sekitar 1/3 dari kejadian abortus spontan diketahui berhubungan dengan abnormalitas pada kromosomnya. Dari 20% kejadian abortus spontan pada manusia, 7% diantaranya disebabkan oleh abnormalitas kromosom zigot yang dikandungnya (Nicholas, 1987).

KESIMPULAN

Dari hasil evaluasi yang dilakukan terhadap embrio mencit dan manusia, dapat diambil beberapa kesimpulan antara lain:

1. Kejadian abnormalitas jumlah kromosom pada blastosis mencit diperoleh sebesar 30,00% berupa embrio N/2N, sedangkan pada blastosis manusia hasil fertilisasi *in vitro* (IVF) didapatkan sebesar 50,00% yang terdiri dari embrio N/2N (12,50%), 2N/4N (12,50%), embrio mosaik 2N/3N/4N (12,50%) dan embrio tetraploidi/4N (12,50%).
2. Kultur *in vitro* dapat mempengaruhi tingkat perkembangan embrio serta dapat meningkatkan terjadinya abnormalitas jumlah kromosom pada embrio yang dihasilkan.
3. Analisa kromosom pada embrio preimplantasi perlu dilakukan untuk menghindari transfer embrio yang berkualitas rendah yang dapat mengakibatkan terlahirnya individu cacat atau mengidap penyakit tertentu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, kontrak nomor: 61/P21PT/DPPM/98/PHB/VII/1/V/ 1998, Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Dirjen Dikti Depdiknas.

DAFTAR PUSTAKA

- Bird BR, Forrester FT. 1981. Basic Laboratory Techniques In Cell Culture. US Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control. Pp:15-32.
- 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.
- Glenister PH, Wood MR, Kirby C, Whittingham DG. 1987. Incidence of chromosome anomalies in first cleavage mouse embryos obtained from frozen-thawed oocytes fertilized *in vitro*. *Gamete Res* 16:205-216.
- Iwasaki S, Shioya Y, Masuda H, Hanada A, Nakahara T. 1989. Incidence of chromosomal anomalies in early bovine embryos derived from *in vitro* fertilization. *Gamete Res* 22:83-91.
- Iwasaki S, Nakahara T. 1990. Incidence of embryos with chromosomal anomalies in the inner cell mass among bovine blastocysts fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 34:683-690.
- Kasai K, Sugimoto M, Takasugi M, Toyoda Y. 1981. Observation on the chromosome number in the first and second cleavage division of mouse embryos derived from fertilization *in vitro*. *Kitasato Arc Exp Med* 54:17-24.
- Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Verschraegen-Spae MR, De Paepe A, Dhont M. 1998. Fluorescent *in-situ* hybridization on human embryos showing cleavage arrest after freezing and thawing. *Hum Reprod* 13:425-429.
- Long SE, Williams C. 1980. Frequency of chromosomal abnormalities in early embryos of the domestic sheep (*Ovis aries*). *J Reprod Fertil* 58:197-201.
- Mohamad K, Eriani K, Djuwita I, Boediono A. 1999. Perkembangan *in vitro* dan *in vivo* embrio mencit tanpa zona pelusida. *Media Vet* 6:1-4.
- Nicholas FW. 1987. Veterinary Genetics. Clarendon Press. Oxford. Pp: 98-152.
- Rosadi B, Boediono A, Agungpriyono S, Mohamad K, Sukra Y. 2001. Chimera production by embryo aggregation method and cultured *in vitro* without zona pellucida in mice. *Reprotech* 1:23-28.
- Sukra Y. 2000. Wawasan Ilmu Pengetahuan Embrio: Benih Masa Depan. Dirjen Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional 2000. hlm 125-153.
- Van der Auwera I, D'Hooghe T. 2001. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod* 16:1237-1243.