

Fusi Sel pada Berbagai Tahap Perkembangan Sel Embrio

Baharuddin Tappa dan Syahrudin Said

Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi-LIPI, Cibinong

ABSTRAK

Teknik fusi sel dilakukan pada genom embrio mamalia untuk mempelajari interaksi inti sitoplasma dan kloning dengan teknik transfer inti. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi sel blastomer genom dari berbagai tahap perkembangan sel embrio mencit dengan menggunakan metode fusi elektrik untuk pengembangan teknik transfer inti. Sel-sel blastomer dari embrio tahap 2, 4, 8, dan 16 sel. Terhadap sel-sel blastomer tersebut diberikan stimulasi elektrik pada kondisi fusi yang berbeda. Embrio yang telah difusi, dikultur dalam inkubator CO₂ dengan konsentrasi CO₂ 5% temperatur 38,5°C selama 96 jam. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa angka fusi yang tertinggi adalah 88,6% dari embrio tahap 2 dan 16 sel yang difusi pada kekuatan pulse 1,5-2,0 kv/cm dalam waktu 60-90 µsec. Sedangkan embrio tahap 16 sel memperlihatkan angka fusi yang terendah 34,3% pada 2,0 kv/cm dengan 90 µsec. Sel blastomer yang telah terjadi fusi setelah dikultur sampai tahap blastosis memperlihatkan bahwa embrio tahap 2-16 sel tidak berbeda pada kekuatan pulsa 1,0-2,0 kv/cm selama 30-90 µsec. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fusi sel dengan metode fusi elektrik dapat digunakan untuk menghasilkan kloning dengan teknik transfer inti.

Kata kunci: Fusi sel, embrio mencit, kloning, transfer inti.

ABSTRACT

The cell fusion technique has been applied on mammalian embryos genome to study nucleo cytoplasmic interaction and the cloning by nuclear transfer technique. The present study was undertaken to find out a suitable condition for blastomer cells genome from different developmental stage of mouse cell embryos using electric fusion to simplify the nuclear transfer technique. Blastomer cell were obtained from 2, 4, 8, and 16 cell stage mouse embryos. The blastomer cells were treated with electric stimulus under different conditions. Fused embryos were cultured in an atmosphere of 5% in air at 38.5°C for 96 hours. The results show that after stimulus of pulse strength 1.5-2.0 kv/cm and pulse duration 60-90 µsec. The fusion rate was high (88.6%) in 2 cell and 16 cell stage embryos. However, when 90 µsec at 2.0 kv/cm was applied fusion rate was low (34.3%) in 16 cell stage embryos. Fused blastomer after *in vitro* culture into blastocyst stage was different from 2-16 cell stage embryos of 30-90 µsec at 1.0-2.0 kv/cm conditions. The study showed that cell fusion using electric fusion can be use to produce cloning embryos.

Key words: Cell fusion, mouse embryos, cloning, nuclear transfer.

PENDAHULUAN

Pemisahan sel blastomer embrio dengan teknik splitting atau kloning bertujuan untuk produksi hewan kembar monozygot identik secara genetik. Pada umumnya kembar monozygot terjadi secara alami pada semua jenis ternak, tetapi frekuensi kejadiannya relatif rendah dan bervariasi di antara spesies.

Produksi kembar identik monozygot secara buatan dengan pemisahan blastomer memungkinkan untuk menghasilkan hewan kembar dan kebuntingan kembar secara genetik. Teknik splitting embrio secara komersial sudah diaplikasikan, namun teknik ini masih mempunyai faktor pembatas, seperti splitting ulang tidak dapat dilakukan. Kelemahan teknik splitting ini dapat diatasi dengan kloning berdasarkan teknik transfer inti (*nuclear transfer*).

Teknik fusi sel telah diaplikasikan pada gamet dan embrio mamalia untuk mempelajari interaksi antara inti dan sitoplasma (Balakier dan Czolowska, 1977; Surani *et al.* 1987). Sejak Mc Grath dan Solter (1983) berhasil mengembangkan teknik transfer inti dengan fusi elektrik pada zygot mencit, telah dilaporkan keberhasilan pada hewan lainnya seperti pada tikus (Kono dan Tsunada, 1988), kelinci (Stice dan Robl, 1988), babi (Prather *et al.*, 1987), domba (Willadsen, 1986; Smith dan Wilmot, 1989) dan sapi (Bondioli *et al.*, 1990). Dengan menggunakan teknik fusi elektrik, variasi antarperlakuan dapat dikurangi sehingga hasil yang konsisten dapat diperoleh. Teknik ini telah menjadi metode yang banyak digunakan untuk penelitian berbagai tahap sel blastomer dan lebih mudah melakukan penggabungan kembali embrio untuk mempelajari interaksi inti-sitoplasma dan kloning.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kondisi yang cocok untuk melakukan fusi sel pada berbagai tahap perkembangan sel embrio untuk menyederhanakan cara kerja *nuclear transfer*.

BAHAN DAN METODE

Hewan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan mencit (*Mus musculus*) betina galur Balb/C dan AJ umur 8-10 minggu. Mencit dipelihara dalam kandang hewan percobaan Puslitbang Bioteknologi-LIPI, Cibinong yang diberi penerangan listrik selama 12 jam (pukul 06.00-18.00 WIB). Pakan berupa pellet dan air minum diberikan secara *ad libitum*.

Mencit betina disuperovulasi dengan injeksi Pregnant Mare's Serum Gonadotrophin (PMSG, Folligon, Intervet, Holland) sebanyak 5,0 IU secara intra peritoneal dan Human Chorionic Gonadotrophin (HCG, Chorulon, Intervet, Holland) sebanyak 5,0 IU, 48 jam setelah pemberian PMSG. Setelah injeksi HCG, mencit betina dicampur dengan mencit jantan. Pada keesokan harinya diperiksa adanya sumbat vagina dan

ditetapkan sebagai hari ke-nol (H_0). Koleksi embrio tahap 2, 4, 8, dan 16 sel dilakukan pada H_1 dan H_2 . Mencit betina yang telah disuperovulasi dimatikan dengan cara dislokasi leher, kemudian dibedah dan diambil saluran reproduksinya berupa oviduct dan uterus. Embrio 2, 4, 8, dan 16 sel dikoleksi dari oviduct dengan media M2 + BSA kemudian dievaluasi di bawah dissecting mikroskop pembesaran 40 kali. Embrio yang terpilih dicuci tiga kali dengan media M16+BSA.

Zona pelusida dilarutkan dengan 0,5% pronase (Actinase, Keken, Pharmaceutical, Co. Ltd, Japan) dalam media M16 tanpa BSA. Setelah zona dilarutkan embrio dipindahkan ke tetesan media M16+BSA dan zona dihilangkan dengan melakukan pipetting. Embrio 2, 4, 8, dan 16 sel tanpa zona selanjutnya dipindahkan ke tetesan media M16+BSA untuk dilakukan pemisahan blastomer dengan bantuan mikro-manipulator. Sel-sel blastomer yang sudah terpisah selanjutnya dipindahkan ke kamar fusi elektrik (*electric fusion chamber*) (Kruss, Hamburg, Jerman) yang terdiri dari dua paralel elektrode dengan jarak antara kedua elektrode adalah 1,0 mm. Kamar fusi di set kemudian diisi dengan larutan 0,3 M Mannitol yang mengandung 0,05 mM $CaCl_2$; 0,1 mM $MgCl_2$; dan 1,0 mg/ml BSA (Taniguchi *et al.*, 1990). Sel-sel blastomer diekuilibrasikan selama lima menit dalam larutan fusi sebelum dimasukkan ke dalam kamar fusi. Fusi elektrik menggunakan mesin fusi elektrik (BIOJET CF, B. Braun, Jerman) dengan program *alternative current* (a.c) 5 V, 500 kHz field selama lima detik. Setelah itu, tiga pulsa *direct current* (d.c) dengan waktu dan kekuatan diberikan selang selang selama satu detik. Parameter yang diukur pulsa d.c masing-masing waktu pulsa adalah 30, 60, dan 90 μ sec dan kekuatan pulsa adalah 0,5; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan interval 10 detik. Embrio yang telah difusi dicuci dalam media M16+BSA dan selanjutnya dikultur dalam inkubator CO_2 dengan konsentrasi CO_2 5%, temperatur 37°C selama 96 jam untuk mengamati perkembangan sampai tahap blastosis. Data (tiga kali ulangan) dari semua perlakuan terhadap perkembangan embrio hasil fusi dianalisis dengan Chi-square test.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh lama dan kekuatan d.c pulses pada sel blastomer embrio 2-sel yang diberikan tiga pulses 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan waktu 30, 60, dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai blastosis secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 1.

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (88,6%) adalah diperoleh apabila embrio diberikan perlakuan pulsa listrik berkekuatan 1,5 kv/cm dengan lama waktu 90 μ sec. Sedangkan angka fusi blastomer yang paling rendah diperoleh pada embrio yang diberikan perlakuan pulsa listrik yang berkekuatan 2,0 kv/cm dan lama 30 μ sec. Apabila embrio diperlakukan pada 1,0 kv/cm dengan waktu 30 dan 90 μ sec, diperoleh angka fusi yang lebih rendah (57,1 dan 64,4%) dibandingkan dengan embrio yang diperlakukan pada 1,5 kv/cm dengan waktu 30 dan 90 μ sec (84,2 dan 88,6%).

Tabel 1. Pengaruh lama dan kekuatan *d.c pulse* terhadap fusi pada tahap embrio 2 sel.

Lama	Kekuatan pulsa	Angka fusi (%)	Angka perkembangan blastosis (%)
30 μ sec	1,0 kv/cm	12/21 (57,1) ^{b,d}	07/12 (58,3) ^{b,d}
	1,5 kv/cm	16/19 (84,2) ^{b,e}	11/16 (68,8) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	13/28 (46,4) ^b	05/13 (38,5) ^{b,j}
60 μ sec	1,0 kv/cm	21/30 (70,0) ^{b,d}	11/21 (52,4) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	23/40 (57,5) ^{b,e}	10/23 (43,5) ^{c,d}
	2,0 kv/cm	34/40 (85,0) ^{b,f}	23/34 (67,6) ^{c,e}
90 μ sec	1,0 kv/cm	29/45 (64,4) ^{b,d}	15/29 (51,7) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	31/35 (88,6) ^{b,e}	21/31 (67,7) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	27/40 (67,5) ^{b,d}	15/27 (55,6) ^{c,f}

Keterangan: ^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer
^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)
^{d,f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Perkembangan embrio setelah dikultur berupa sel kompak setelah 36 jam kultur (sekitar 4-8 sel) dan berkembang sampai tahap blastosis selama 92 jam. Embrio yang diperlakukan dengan pulsa listrik berkekuatan 1,5 kv/cm dengan lama 30 dan 90 μ sec diperoleh angka fusi masing-masing 68,8% dan 67,7%. Sedangkan perkembangan embrio yang paling rendah diperoleh pada embrio yang diperlakukan 2,0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec.

Pengaruh lama dan kekuatan *d.c pulse* pada sel blastomer embrio 4-8 sel yang diberikan tiga macam pulse 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan waktu 30, 60 dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis secara *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 2.

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (80,0%) pada embrio yang diberikan kekuatan *d.c pulse* 1,5 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan angka fusi blastomer paling rendah (53,6%) pada perlakuan *d.c pulse* 1,0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec.

Apabila embrio diperlakukan dengan waktu 60 μ sec pada kekuatan *d.c pulse* 1,0, 1,5 dan 2,0 kv/cm diperoleh angka fusi lebih tinggi dibanding dengan waktu 30 dan 90 μ sec pada perlakuan *d.c pulse* 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm. Begitu juga perkembangan embrio sampai tahap blastosis paling tinggi pada perlakuan *d.c pulse* 1,5 kv/cm dengan lama waktu 90 μ sec.

Pengaruh lama dan kekuatan *d.c pulse* pada sel blastomer embrio 16-sel yang diberikan tiga macam pulsa 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan waktu 30, 60, dan 90 μ sec terhadap fusi dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2. Pengaruh lama dan kekuatan *d.c. pulse* terhadap fusi pada tahap embrio 4-8 sel.

Lama	Kekuatan pulsa	Angka fusi ^a (%)	Angka perkembangan blastosis (%)
30 μ sec	1,0 kv/cm	15/28 (53,6) ^{b,d}	09/15 (60,0) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	11/18 (61,1) ^{b,e}	07/11 (63,6) ^{b,d}
	2,0 kv/cm	16/30 (53,3) ^{b,d}	08/16 (50,0) ^{b,e}
60 μ sec	1,0 kv/cm	22/35 (62,9) ^{b,d}	12/22 (54,5) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	25/40 (62,5) ^{b,d}	11/25 (44,0) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	29/40 (72,5) ^{b,e}	20/29 (68,9) ^{c,j}
90 μ sec	1,0 kv/cm	21/35 (60,0) ^{b,d}	11/21 (52,4) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	31/40 (77,5) ^{b,e}	21/31 (67,7) ^{c,d}
	2,0 kv/cm	20/30 (66,7) ^{b,f}	12/20 (60,0) ^{c,e}

Keterangan: ^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer
^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)
^{d-f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Tabel 3. Pengaruh lama dan kekuatan *d.c. pulse* terhadap fusi pada tahap embrio 16 sel.

Lama	Kekuatan pulsa	Angka fusi ^a (%)	Angka perkembangan blastosis (%)
30 μ sec	1,0 kv/cm	21/40 (52,5) ^{b,d}	10/21 (47,6) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	28/40 (70,0) ^{b,e}	18/28 (64,3) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	30/35 (85,7) ^b	22/30 (73,3) ^c
60 μ sec	1,0 kv/cm	21/34 (61,7) ^{b,d}	16/21 (76,2) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	30/38 (78,9) ^{b,e}	26/30 (86,7) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	31/35 (88,6) ^{b,f}	28/31 (90,3) ^{b,f}
90 μ sec	1,0 kv/cm	22/40 (55,0) ^{b,d}	14/22 (63,6) ^{c,d}
	1,5 kv/cm	29/40 (72,5) ^{b,e}	24/29 (82,8) ^{c,e}
	2,0 kv/cm	32/35 (91,4) ^{b,f}	30/32 (93,8) ^{b,f}

Keterangan: ^a Jumlah blastomer yang terjadi fusi/jumlah total blastomer
^{b,c} Nilai dengan huruf berbeda pada garis yang sama significantly different (P<0,05)
^{d-f} Nilai dengan huruf berbeda pada kolom yang sama significantly different (P<0,05)

Angka fusi blastomer yang paling tinggi (70,0-85,7%) diperoleh apabila embrio difusi pada perlakuan 1,5-2,0 kv/cm dengan waktu 30 μ sec dan 78,9-88,6% pada perlakuan 1,5-2,0 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan embrio yang difusi pada kekuatan *d.c pulse* 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec memberikan hasil fusi yang rendah, masing-masing 55,0%; 47,5%; dan 34,3%. Perkembangan embrio sampai tahap blastosis paling tinggi (90,3%) pada blastomer yang difusi dengan perlakuan 2,0 kv/cm dengan waktu 60 μ sec. Sedangkan yang paling rendah dan paling banyak terjadi kerusakan sel blastomer (lysis) terjadi pada perlakuan *d.c pulse* 2,0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec.

Hasil penelitian tersebut memperlihatkan bahwa fusi sel blastomer dan perkembangan embrio sampai tahap blastosis secara *in vitro* dari embrio tahap 2, 4, 8 dan 16 sel dengan perlakuan kekuatan dan waktu *d.c pulse* yang berbeda-beda memberikan hasil yang berbeda-beda pula. Hal ini sesuai dengan Taniguchi *et al.* (1991) menggunakan pasangan blastomer dari embrio mencit tahap 2 dan 4 sel, Funahashi dan Niwa (1990) menggunakan embrio tikus 2 sel. Telah diamati bahwa terjadi perbedaan angka fusi blastomer pada setiap tahap perkembangan embrio. Embrio tahap 2 sel, angka fusi terendah diperoleh pada perlakuan 1,0-2,0 kv/cm dan 30 μ sec. Ini memperlihatkan bahwa dengan *d.c pulse* ini kemungkinan waktu yang digunakan masih sangat singkat dan kekuatan *d.c pulse* lemah sehingga menyebabkan belum terjadi fusi yang sempurna. Berbeda dengan waktu 90 μ sec memperlihatkan angka fusi yang tinggi pada *d.c pulse* 1,0-2,0 kv/cm. Sedangkan pada embrio tahap 4-8 sel dengan perlakuan *d.c pulse* 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm pada waktu yang sama yaitu 60 μ sec memberikan hasil yang tinggi. Ini menunjukkan bahwa embrio tahap 4-8 sel sudah sesuai dengan kondisi waktu 60 μ sec dibandingkan dengan waktu 30 dan 90 μ sec. Pada embrio tahap 16 sel, dengan perlakuan *d.c pulse* 1,0; 1,5; dan 2,0 kv/cm dengan waktu 90 μ sec embrio banyak mengalami kerusakan sel (lysis) sehingga angka fusi dan perkembangan embrio menjadi rendah. Ini menunjukkan bahwa kekuatan *d.c pulse* sangat kuat dan waktu yang digunakan terlalu lama. Pada embrio tahap 16 sel bentuk sel blastomernya lebih kecil dibanding dengan embrio tahap 2 dan 4-8 sel sehingga sel blastomer 16 sel mudah mengalami kerusakan pada waktu dilakukan fusi.

Berdasarkan hasil tersebut, bahwa terjadinya fusi blastomer adalah tergantung pada waktu, kekuatan *d.c pulse* dan tahap sel blastomer, hal ini sama dengan yang pernah dilaporkan oleh peneliti-peneliti sebelumnya (Taniguchi *et al.*, 1991; Kubiak dan Tarkowski, 1985). Apabila kekuatan dan waktu *d.c pulse* meningkat, menyebabkan kerusakan pada sel blastomer, sedangkan sebaliknya apabila kekuatan dan waktu *d.c pulse* terlalu rendah, kemungkinan tidak terjadi fusi. Oleh karena itu, kondisi yang cocok merupakan faktor penting dalam melakukan fusi sel. Proses terjadinya fusi juga sangat ditentukan oleh struktur membran sel blastomer. Kondisi yang cocok untuk melakukan fusi pada blastomer tanpa zona pellucida berbeda dengan blastomer yang masih dilengkapi zona pellucida. Begitu juga tahap perkembangan embrio dan kondisi sitoplasma embrio. Oleh karena itu, penting untuk melakukan penelitian terhadap fusi sel blastomer-sitoplasma, termasuk mengamati dari berbagai sumber sitoplasma yang digunakan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa embrio tahap 2-sel diperoleh angka fusi yang paling tinggi pada kekuatan dan waktu *d.c pulse* 1,5 kv/cm dengan waktu 30 μ sec dan 90 μ sec. Pada embrio tahap 4-8 sel diperoleh angka fusi yang tinggi pada perlakuan *d.c pulse* 1,5 kv/cm dan 60 μ sec.

Pada embrio tahap 16 sel angka fusi tertinggi pada *d.c pulse* 2,0 kv/cm dan 60 μ sec. Sedangkan kerusakan embrio yang paling tinggi terjadi pada perlakuan 2,0 kv/cm dan 90 μ sec pada embrio tahap 16 sel. Keberhasilan fusi sel untuk memproduksi hewan kloning ditentukan oleh tahapan sel blastomer, teknik dan alat yang digunakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Balakier, H. and R. Czolowska. 1977.** Cytoplasmic control of nuclear maturation in mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* 110: 446-469.
- Bondioli K.R., M.E. Wasthusin, and C.R. Looney. 1990.** Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 33: 165-174.
- Funahashi, H. and K. Niwa. 1990.** Electric fusion of 2-cell rat embryo blastomeres. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 36: 114-119.
- Kubiak, J.Z. and A.K. Tarkowski. 1985.** Electro fusion of mouse blastomeres. *Exp. Cell Res.* 157: 561-566.
- Kono, T. and Tsunada. 1988.** Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1300-1302.
- Mc Grath, J. and D. Solter. 1983.** Nuclear transformation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220: 1300-1302.
- Prather, R.S., F.L. Barnes, M.M. Sims, J.M. Robl, W.H. Eyestone, and N.F. First. 1987.** Nuclear transplantation in the bovine embryo: assesement of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.* 37: 859-866.
- Smith, L.C., and I. Wilmut. 1989.** Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development *in vivo* of sheep embryos after transplantation. *Biol. Reprod.* 40: 1027-1035.
- Stice, S.L. and J.M. Robl. 1988.** Nuclear roprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod.* 39: 657-664.
- Surani, M.A.H., S.C. Barton, and M.L. Norris. 1987.** Experimental reconstruction of mouse eggs and embryos: an analysis of mammalian development. *Biol. Reprod.* 36: 1-16.
- Taniguchi, T., H.T. Cheong, and Kanagawa. 1991.** Fusion and development rates of single blastomere pairs of mouse two and four-cell embryos using the electrofusion method. *Theriogenology* 36(4): 645-653.
- Willadsen, S.M. 1986.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320: 63-65.