

Perkembangan Partenogenetik dari Oosit Mencit yang Diaktivasi dengan Ethanol dan 6-DMAP Secara In Vitro

Partenogenetic Development of Mouse Oocytes Activation Using Ethanol and 6-DMAP by In Vitro

¹Agung Pramana W. Marhendra, ²Arief Boediono

¹Fakultas MIPA Unibraw,

²Fakultas Kedokteran Hewan

Jl. Veteran 16, Malang 65145, Telp. 0341 575838

Email : Apramono@brawijaya.ac.id

Abstract

The aim of this research is to confirm ethanol used on mouse oocytes activation, partenogenetic oocytes development after induced by 6-DMAP and producing partenogenetic diploid embryo. Activation of partenogenetic oocytes were done by incubating unfertilized oocytes on M-2 medium containing 70 % ethanol for 57 minutes. Partenogenetic oocytes were prepared by incubation on CZB medium containing 2mM 6-DMAP for 3 hours after after ethanol activation. Developpement of partenogeneic embryos were evaluated for 4 hours on CZB medium. The The partenogenetic mouse oocytes actived by ethanol were corfirmed by production of Polarbody II , pronucleus and cells devided and resulted 2 and 4 cells. The oocytes non activated by ethanol were not devided. The combination treatment ethanon and 6-DMAP decreasing number of patrenogenetic diploid oocytes and followed by blastocyst production and polyploid embryos.

Keywords : partenogenetik, mencit, ethanol, 6-DMAP

Pendahuluan

Oosit mammalia yang diovulasi memerlukan aktivasi sebelum terjadi penerusan pembelahan meiosis. Aktivasi oosit dapat terjadi karena penetrasi spermatozoa (fertilisasi) atau aktivasi partenogenesis. Aktivasi karena fertilisasi disebabkan oleh adanya interaksi antara spermatozoa dan oosit. Aktivasi partenogenesis dapat dilakukan dengan shock dingin (Shapiro 1942), ethanol (Nagai 1987), elektrik (Tarkowski *et al.* 1970), sentrifugasi (Wall dan Hawk 1988), calcium ionophora/ionomycin (Susko-Parrish *et al.* 1994, Uranga *et al.* 1996, Soloy *et al.* 1997, Loi *et al.* 1998) dan inhibitor inosine monophosphate dehidrogenase (Downs 1990).

Penggabungan spermatozoa pada membran oosit memicu serangkaian reaksi dalam membran oosit sehingga menyebabkan ion kalsium dilepaskan ke dalam ooplasma (Miyazaki *et al.* 1993). Pada mencit besarnya kalsium internal yang dilepas mempengaruhi penerusan siklus sel (Vincent *et al.* 1992). Secara normal, setelah aktivasi pada oosit tahap metafase II terjadi penerusan siklus sel menuju tahap anafase dan membentuk polarbodi II selanjutnya sel memasuki tahapan interfase (Vincent 1992, Susko-Parrish *et al.* 1994, Soloy *et al.* 1997). Terbentuknya polarbodi II menyebabkan oosit haploid.

Embrio partenogenetik diploid dapat dihasilkan dengan menghambat pengeluaran polarbodi II pada tahap meiosis II. Keluarnya polarbodi II dapat dihambat dengan menggunakan cytochalasin B dan D (Boediono *et al.* 1995, Loi 1998), serta 6-DMAP (Szöllösi *et al.* 1993). Hasil penelitian menunjukkan bahwa cytochalasin B dan D dapat digunakan untuk diploidisasi oosit mencit (Balakier dan Tarkowski 1975, Kubiak *et al.* 1991, Imahie *et al.* 2002) dan sapi (Kano *et al.* 1989, Minamihashi *et al.* 1991, Boediono *et al.* 1995). Pemberian cytochalasin selama pembelahan sel tidak mempengaruhi replikasi DNA dan pembelahan inti (karyokinesis) pada saat anafase II tetapi mampu mencegah proses sitokinesis sehingga dapat mencegah pengeluaran polarbodi II.

Perlakuan dengan 6-DMAP setelah aktivasi oosit dapat mencegah pengeluaran polarbodi II (Szöllösi *et al.* 1993), menyebabkan pronuleus terbentuk lebih awal dan menyebabkan oosit memasuki tahap interfase (Szöllösi *et al.* 1993, Susko-Parrish *et al.* 1994) sehingga terjadi diploidisasi oosit

Penelitian ini bertujuan untuk melihat pengaruh ethanol dalam mengaktifasi oosit, mengetahui pengaruh ethanol dan 6-DMAP terhadap perkembangan oosit partenogenetik dan memperoleh embrio partenogenetik diploid.

Dalam penelitian ini diketahui bahwa ethanol mampu mengaktifasi oosit mencit hasil ovulasi dengan persentase tinggi. Walaupun terjadi penerusan pembelahan meiosis yang ditandai dengan polarbodi II serta dimulainya pembelahan mitosis namun embrio tidak dapat mengalami pembelahan lebih lanjut. Perlakuan dengan 6-DMAP setelah proses aktivasi dengan etanol menyebabkan embrio mampu berkembang mencapai tahap blastosis.

Materi dan Metode Penelitian

Bahan dan Tempat Penelitian

Sumber oosit diperoleh dari mencit (*Mus musculus*) BALB/C (Biofarma Bandung). Mencit tersebut diperbanyak di Laboratorium Reproduksi dan Kebidanan Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Hewan ini dipelihara dalam kandang dan diberikan pakan secara terkontrol sedangkan air diberikan ad libitum.

Mencit Balb/C digunakan sebagai sumber oosit untuk aktivasi parthenogenesis, Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Embriologi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Aktivasi Oosit Parthenogenetik

Untuk mengevaluasi pengaruh ethanol terhadap aktivasi oosit, oosit terovulasi diinkubasi dalam medium M-2 (Hogan *et al.* 1986) dengan penambahan ethanol (Merck) 7% selama 7 menit. Oosit kemudian dikultur dalam medium CZB dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% yang bersuhu 37°C. Oosit

yang tidak diperlakukan dengan ethanol juga dikultur dan digunakan sebagai kontrol. Perkembangan oosit dalam kultur diamati setelah 2 hari dalam medium kultur. Pengamatan dilakukan terhadap ada tidaknya perkembangan oosit dan jumlah oosit yang berkembang.

Perkembangan Oosit Partenogenetik setelah Perlakuan 6-Dimethylaminopurine (6-DMAP)

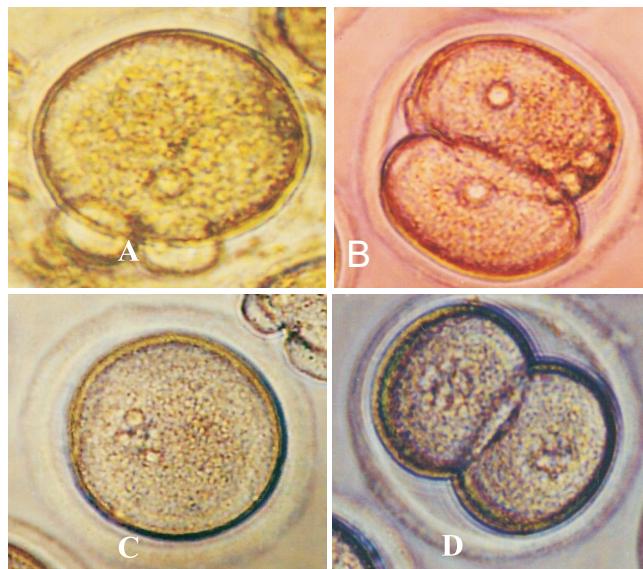
Oosit yang telah diaktifasi dengan ethanol dicuci 3 kali dengan medium M-2 dan diinkubasi dalam medium CZB yang mengandung 6-DMAP (Sigma) 2 mM selama 3 jam. Selanjutnya oosit dicuci 3 kali dalam medium kultur untuk membersihkan sisa 6-DMAP dan dikultur kembali dalam medium CZB yang ditambah glukosa serta diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37°C. Oosit yang tidak diperlakukan dengan ethanol dan 6-DMAP juga dikultur dan digunakan sebagai kontrol.

Perkembangan oosit partenogenetik diamati setelah 4 hari dalam medium kultur. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah oosit yang berkembang pada tahap 2, 4, 8, dan 16/morula serta oosit yang berkembang abnormal.

Hasil dan Pembahasan

Aktivasi Oosit Parthenogenetik

Ethanol yang ditambahkan dalam medium dapat mengaktifasi oosit yang tidak difertilisasi. Oosit yang belum teraktivasi mempunyai satu polarbodi I. Oosit dengan polarbodi I ini menunjukkan bahwa oosit



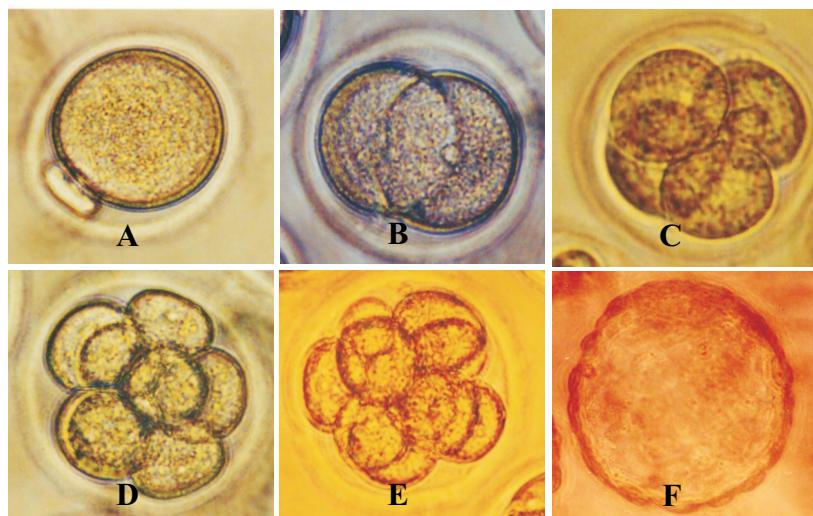
Gambar 1. Oosit mencit setelah perlakuan dengan ethanol. A. Oosit teraktivasi dengan polarbodi II, B. Oosit teraktivasi yang telah membelah menjadi 2 sel, C. oosit tahap 2 sel dengan 4 pronukleus, dan D. Oosit tahap 2 sel dengan 4 pronukleus.

Tabel 1. Pengaruh ethanol pada aktivasi oosit yang tidak terfertilisasi setelah dikultur selama 2 hari

Konsentrasi etanol (%)	Jumlah oosit yang diuji	Jumlah oosit yang berkembang (%)			Degenerasi
		1 sel	2 sel	4 sel	
0 (kontrol)	79	58 (73)	5 (6)	0 (0)	16 (20)
7	125	17 (14)	83 (66)	18 (14)	7 (6)

Tabel 2. Pengaruh 6-DMAP terhadap perkembangan oosit partenogenetik setelah dikultur selama 4 hari

Perlakuan	Jumlah oosit yang diuji	Jumlah oosit yang berkembang (%)			Abnormal
		2 sel	4 sel	8 sel	
0 (kontrol)	79	58 (73)	5 (6)	0 (0)	16 (20)
7	125	17 (14)	83 (66)	18 (14)	7 (6)



Gambar 2. Perkembangan oosit partenogenetik yang diaktifasi dengan ethanol dan 6-DMAP. A. Oosit dengan polarbodi I, B. Embrio tahap 2 sel, C. Embrio tahap 4 sel, D. Embrio tahap 8 sel, E. Embrio tahap 16 sel (morula), dan F. Blastosis

telah menyelesaikan pembelahan meiosis I. Lima jam setelah perlakuan dengan ethanol, oosit mulai teraktivasi yang ditunjukkan dengan adanya satu pronukleus dan polarbodi II dan oosit yang telah membelah menjadi 2 sel. Perkembangan oosit partenogenetik yang diaktifasi dengan ethanol sangat bervariasi. Variasi ini dapat dilihat setelah pembelahan pertama. Salah satu bentuk penyimpangan yang terjadi setelah pembelahan pertama adalah ditemukannya bentuk poliploid. Poliploid dijumpai pada oosit tahap 1 sel (Gambar 1C) dan oosit tahap 2 sel (Gambar 1D).

Pengaruh ethanol terhadap jumlah oosit yang teraktivasi disajikan pada Tabel 1. Pada kondisi kontrol (tanpa ethanol), oosit tidak teraktivasi dan tidak mampu berkembang normal, meskipun ada sebagian yang

dapat membelah menjadi 2 sel namun persentasenya sangat rendah (6%). Pemaparan oosit pada medium kultur yang mengandung ethanol 7% selama 5 menit mampu mengaktifasi oosit sehingga oosit mampu berkembang. Persentase oosit yang berkembang menjadi embrio 2 sel dan 4 sel sebesar 66% dan 14% (Tabel 1). Hasil ini memberikan bukti bahwa etanol dapat digunakan sebagai aktivator yang cukup efektif. Walaupun mampu mengaktifasi oosit, namun demikian perlakuan ethanol saja belum mampu memacu perkembangan oosit ke tahap lebih lanjut. Oleh karena untuk memacu perkembangan oosit ke tahapan lebih lanjut maka dalam penelitian ini juga dievaluasi pengaruh 6-DMAP terhadap perkembangan oosit partenogenetik.

Perkembangan Oosit Partenogenetik setelah Perlakuan 6-DMAP

Untuk mengetahui pengaruh 6-DMAP terhadap perkembangan oosit partenogenetik maka dalam penelitian ini dilakukan evaluasi perkembangan oosit yang tidak difertilisasi dalam media yang mengandung ethanol dengan 6-DMAP dibandingkan dengan perkembangan oosit dalam media yang hanya mengandung ethanol saja atau perkembangan oosit yang telah difertilisasi tetapi tanpa ethanol. Pengaruh 6-DMAP terhadap perkembangan oosit yang tidak difertilisasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Oosit terfertilisasi yang dikultur selama 4 hari pada media CZB mampu berkembang sampai tahapan morula dengan persentase 5%. Perlakuan ethanol efektif dalam mengaktifasi oosit untuk melanjutkan siklus pembelahannya tetapi tidak mampu mendukung perkembangan oosit ke tahapan yang lebih lanjut. Perlakuan ethanol hanya mampu memacu perkembangan oosit sampai pada tahapan 8 sel. Tetapi perlakuan ethanol yang dikombinasikan dengan 6-DMAP mampu meningkatkan jumlah oosit yang berkembang dan memacu perkembangan oosit sampai pada tahapan morula. Persentase oosit yang berkembang pada perlakuan ethanol dan 6-DMAP hampir sama dengan persentase perkembangan oosit yang telah difertilisasi tetapi tanpa perlakuan (Tabel 2). Representasi perkembangan oosit yang diaktifasi dengan ethanol dan 6-DMAP dapat dilihat pada Gambar 2.

Induksi partenogenesis pada oosit mamalia memerlukan stimulasi pelepasan kalsium sehingga pembelahan meiosis II dapat berlangsung. Secara alamiah masuknya sperma ke dalam oosit merupakan signal aktivasi.

Oosit setelah menyelesaikan pembelahan meiosis I akan memasuki tahap istirahat, sampai ada stimulus yang akan mendorong proses pembelahan sel lebih lanjut. Tahap istirahat ini dipelihara oleh MPF dan /atau CFS (Gabrielli *et al.* 1993, Watanabe *et al.* 1989). Keberadaan ion Ca^{+} menginisiasi inaktivasi dengan cepat histone H1 kinase dan kemungkinan MPF (Collas *et al.* 1993). Aktivasi MPF ini mengakibatkan oosit melanjutkan proses pembelahannya dan memulai siklus pembelahan pertama.

Perlakuan dengan ethanol terbukti mampu mengaktifasi oosit mencit yang ditandai dengan proses pembelahan pembelahan inti, dan munculnya polarbodi II. Aktivasi oosit dengan ethanol telah dilakukan pada oosit mencit (Deng dan Fang, 1994; Imahie *et al.*, 2002) dan sapi (Fukui *et al.* 1992).

Menurut Sun *et al* (1991) dan Susko-Parrish *et al.* (1994), ethanol menginduksi peningkatan ion kalsium sebagai hasil dari masuknya ion kalsium ekstraseluler dan yang berasal dari tempat penyimpanan intraseluler. Pelepasan kalsium ke dalam sitoplasma penting untuk mengaktifkan reaksi sistemik pada oosit yang selanjutnya menyebabkan penerusan pembelahan meiosis (Berridge 1991, Susko-Parrish et al. 1994).

Walaupun dapat mengaktifasi oosit namun demikian ethanol tidak mampu memacu perkembangan oosit partenogenetik secara normal. Ethanol hanya mampu memacu perkembangan oosit pada tahapan 8 sel dengan persentase yang sangat rendah. Kemampuan berkembang yg sangat rendah ini kemungkinan karena sifat haploid dari oosit yang diaktifasi dengan etanol. Menurut (Kim *et al.* 1997), ploidi pada embrio babi partenogenetik berpengaruh pada kemampuannya berkembang menjadi blastosis. Embrio haploid pada mammalia kapasitas untuk berkembang lebih rendah dibandingkan dengan embrio yang diploid.

Sifat haploid pada embrio partenogenetik disebabkan tidak adanya kromosom tambahan dari spermatozoa dan terbentuknya polarbodi II. Pada proses perkembangan normal, oosit yang terfertilisasi akan mengalami proses penerusan meiosis II sampai terbentuk polarbodi II, namun karena adanya pronukleus dari oosit sendiri serta dari spermatozoa yang menyatu maka sifat diploid dapat dipelihara. Sedangkan pada embrio parthenogenetik setelah proses aktivasi akan segera terjadi penerusan pembelahan meiosis, sehingga inti yang membela masing masing bersifat haploid.

Supaya diperoleh embrio parthenogenetik yang diploid tanpa tambahan kromosom dari spermatozoa maka perlu dilakukan usaha untuk menekan pembentukan polosit. Hal ini dilakukan dengan memperlakukan oosit yang telah teraktivasi dengan 6-DMAP sehingga inti sel yang telah membelah akan terkondensasi selayaknya pembentukan pronukleus jantan dan betina pada fertilisasi normal. Dengan terkondensasinya pronukleus tadi akan memungkinkan adanya integrasi keduanya, selanjutnya membentuk inti baru yang diploid.

Dalam penelitian ini diketahui perlakuan 6-DMAP pada oosit yang telah diaktifasi dengan ethanol dapat meningkatkan jumlah oosit partenogenetik yang berkembang dan mampu memacu perkembangan oosit sampai pada tahapan blastosis.

Hasil penelitian sebelumnya juga telah

dilaporkan bahwa pemaparan oosit dengan 6-DMAP menyebabkan oosit memasuki tahap interfase mitosis pertama (Susko-Parish et al. 1994). Pada oosit mencit perlakuan dengan 6-DMAP menyebabkan terbentuknya 2 pronukleus dengan ukuran normal (Szöllösi, 1993) sedangkan pada domba terbentuk satu pronukleus yang diploid (Loi et al. 1998).

Selain oosit haploid dan diploid, dalam penelitian ini juga teramati embrio/osit poliploid. Heteroploidi merupakan kejadian umum yang sering teramati pada embrio parthenogenetik yang terjadi secara spontan atau diinduksi dengan bahan kimia (Winger et al. 1997). Kaufman (1983), menyatakan bahwa selain haploid, sebagian oosit (20%) yang diaktivasi menggunakan alkohol bersifat aneuploidi sebagai hasil aneuploidi. Embrio haploid dan aneuploid akan mati sebelum mencapai tahap blastosis.

Kesimpulan

Ethanol dapat mengaktifasi oosit partenogenetik mencit. Aktivasi oosit ditandai dengan terbentuknya polarbodi II, pronukleus, dan kemampuan membelah menjadi 2 sel dan 4 sel, sedangkan oosit yang tidak diperlakukan dengan ethanol tidak teraktivasi dan tidak mampu berkembang. Kombinasi ethanol dengan 6-DMAP mampu meningkatkan jumlah oosit diploid partenogenetik yang berkembang dan memacu perkembangan oosit sampai pada tahapan blastosis. Selain embrio partenogenetik diploid, beberapa oosit berkembang menjadi embrio poliploid.

Daftar Pustaka

- Balakier H, Tarkowski AK. 1976. Diploid Parthenogenetic Mouse Embryos Produced by Heat Shock and Cytochalasin B. *J Embryol Exp Morph* 35:25-39.
- Barton SC, Surani MAH, Norris ML. 1984. Role of Paternal and Maternal Genomes in Mouse Development. *Nature* 311:374-376
- Berridge MJ. 1985. The Molecular Basis of Communication with the Cell. *Sci Am* 253: 142-152.
- Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T. 1995. Development In Vitro and In Vivo of Aggregated Parthenogenetic Bovine Embryos. *Reprod Fert Dev* 7: 1073-1079.
- Collas P, Robl JM. 1990. Factors Affecting the Efficiency of Nuclear transplantation in the Rabbit Embryo. *Biol Reprod* 43:877-884.
- Downs SM. 1990. Stimulation of Parthenogenesis in Mouse Ovarian Follicles by Inhibitor of Inosine Monophosphate Dehydrogenase. *Biol Reprod* 43: 427-436.
- Imahie H, Takahashi M, Toyoda Y, Sato E. 2002. Differential Effects of Cytochalasin B on Cytokinesis in Parthenogenetically Activated Mouse Oocytes. *J Reprod Dev* 48, 1:31-40.
- Kaufman MH. 1983. Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies. Cambridge University Press.
- Kubiak JZ. 1989. Mouse Oocytes Gradually Develop the Capacity for Activation during the Metaphase Arrest. *Develop Biol* 136:537-545.
- Kubiak JZ, Weber M, de Pennart H, Winston N, Maro B. 1993. The Metaphase II Arrest in Mouse Oocyte is Controlled Through Microtubule-dependent Destruction of Cyclin B in the Presence of CSF. *J Embryol* 12:3773-3778.
- Kim NH, Uhm SJ, Ju JY, Lee HT, Chung KS. 1997. Blastocoel Formation and Cell Allocation to the Inner Cell Mass and Trophectoderm in Haploid and Diploid Pig Parthenotes Developing In Vitro. *Zygote* 5: 365-370.
- Loi P, Ledda S, Fulka J Jr, Cappai P, Moor RM. 1998. Development of Parthenogenetic and Cloned Ovine Embryo: Effect of Activation Protocols. *Biol Reprod* 58: 1177-1187.
- Minamihashi A, Watson AJ, Watson PH, Church RB, Schultz GA. 1992. Bovine Parthenogenetic Blastocysts Following In Vitro Maturation and Oocyte Activation with Ethanol. *Theriogenology* 40:63-76.
- Miyazaki S, Shirakawa K, Nakada K, Honda Y. 1993. Essential Role of the Inositol 1,4,5 Triphosphate Receptor Ca²⁺ Release Channel in Ca²⁺ wave ad Ca²⁺ Oscillation at Fertilization in Mammalia Egg. *Dev Biol* 158:62-78
- Nagai T. 1987. Pathogenetic Activation of Cattle Follicular Oocytes In Vitro with Ethanol. *Theriogenology* 37: 869-875
- Shapiro H. 1942. Parthenogenetic Activation of Rabbit Eggs. *Nature (Lond)* 149: 304
- Soley E, Kanka J, Viuff D, Smith SD, Callesen H, Greve T. 1997. Time Course of Pronuclear Deoxyribonucleic Acid Synthesis in Parthenogenetically Activated Bovine Oocytes. *Biol Reprod* 57:27-35

- Szöllösi MS, Kubiak JZ, Pascale Debey, Henri de Pennart D, Szöllösi B, Maro. 1993, Inhibition of Protein Kinases by 6-Dimethylaminopurine Accelerates the Transition to Interphase in Activated Mouse Oocytes. *J Cell Science* 104: 861-872
- Sun FJ, Hoyland J, Huang X, Mason W, Moor RM. 1991. A comparison of Intracellular Change in Porcine Egg after Fertilization and Electroactivation. *Development* 115:947-957
- Susko-Parry JL, Liefried-Rutledge ML, Northey DL, Schutzkus V, Fist NL. 1994. Inhibition of Protein Kinase After Induced Calcium Transient Causes Transition of Bovine Oocytes to Embryonic Cycles Without Meiotic Completion. *Dev Biol* 166: 729-739.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of Reconstituted Mouse Eggs Suggest Imprinting of Genome During Gametogenesis. *Nature* 308:548-550.
- Uranga JA, Pedersen RA, Arechaga J. 1996. Parthenogenetic Activation of Mouse Oocytes Using Calcium Ionophores and Protein Kinase C Stimulator. *J Dev Biol* 40: 515-519
- Wall RJ, Hawk HW. 1988. Development of centrifuged Cow Zygotes Cultured in Rabbit Oviducts. *J Reprod Fertil* 82:673-680.
- Watanabe N, Vandewoude G, Ikawa F, Sagata N. 1989. Specific Proteolysis of the c-mos Protooncogene Product by Calpain on Fertilization of Xenopus Eggs. *Nature (Lond.)* 342:505-511.
- Winger QA, De La Fuente R, King WA, Armstrong DT, Watson AJ. 1997. Bovine Parthenogenesis is Charaterized by Abnormal Chromosomal Complements: Implication for Maternal and Paternal co-dependence During Early Bovine Development. *Dev Genet* 21:160-166.