

Dinamika Aktivitas Maturation Promoting Factor (MPF) pada Oosit Ikan Mas Setelah Aktivasi Secara Artifisial**The Dynamic of Maturation Promoting Factor (MPF) on *Cyprinus carpio* Oocytes After Induced by Artificial Activation****Agung Pramana Warih Marhendra, Aris Soewondo**

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya Malang
Email : agung_pramana@ub.ac.id

Abstract

To pursue the aim, many experiments will be carry out including development of activation technique, production of diploid parthenogenetic embryo. Furthermore, the result of study will be used as a basic for preparation for cloning program which will be proposed for further advanced experiment.

Observation of the effect of oocyte activation using different methods have been reported. We have found Calcium-ionophore, ethanol and variation with DMAP, cytochalasin as a chemical that can induce oocyte development without fertilization. A study about the effect of methods and activation media is necessary in order to obtain the optimum condition that can support normal oocyte development.

The targets of this experiments are : (1) establishment of activation procedure to obtain diploid parthenogenetic embryo; (2) to determine characteristic of dynamics activities of Maturation Promoting factor (MPF) through activities Cdc2 kinase on early development after treatment.

Keywords : MPF, Cdc2, ikan mas , 6-DMAP, sitokalsin

Pendahuluan

Ginogenesis adalah salah satu cara reproduksi yang tidak biasa namun telah diterapkan pada berbagai jenis ikan (Gui, 1989). Pada *Cyprinus carpio*, ginogenesis diinduksi menggunakan sperma yang telah radiasi selanjutnya dilakukan perlakuan untuk diplodisasi (Taniguchi *et al.*, 1986; Komen *et al.*, 1991). Diplodisasi perlu dilakukan karena pada ginogenesis yang bersifat haploid mengalami perkembangan yang kurang baik yang dikenal sebagai haploid sindrom (Wu *et al.*, 1981). Diplodisasi dengan menekan dikeluarkannya badan kutub II dengan menggunakan stress panas atau stress dingin (Komen *et al.*, 1988; Pandian and Koteeswaran, 1998), dan perkembangannya berjalan normal.

Hal yang menarik pada ikan bahwa tanpa kontribusi genom paternal embrio dapat berkembang sampai dihasilkan anak yang normal. Hal ini berbeda dengan yang terjadi pada mamalia. Pada mamalia embrio tidak akan berkembang sampai menjadi anak jika tidak ada kontribusi

material genetik dari kedua induk jantan dan betina (Surani *et al.*, 1986).

Berbeda dengan ginogenesis, partenogenesis merupakan perkembangan yang sama sekali tidak melibatkan sperma. Induksi partenogenesis pada berbagai hewan telah berkembang seiring dengan pemahaman yang lebih baik terhadap mekanisme yang terjadi pada awal pembelahan sel telur. Berbagai cara untuk aktivasi antara lain dengan menggunakan shock dingin (Shapiro 1942), etanol (Nagai 1987; Boediono *et al.*, 1995), elektrik, *calcium ionophore* atau ionomycin (Uranga *et al.*, 1996, Loi *et al.*, 1998) dan inhibitor ionomycine monophosphate dehidrogenase (Downs 1990) berhasil menginduksi terjadinya partenogenesis pada berbagai jenis hewan.

Oosit yang diovulasikan dari ovarium berada dalam tahap istirahat yang dipelihara oleh *Maturation promoting factor* (MPF) dan/atau *Cytostatic factor* (CSF) (Gabrielli *et al.*, 1993). Keberadaan ion Ca^{2+} menginisiasi inaktivasi dengan cepat histone H1 kinase dan MPF (Collas

et al., 1993). Inaktivasi MPF ini mengakibatkan oosit melanjutkan proses pembelahan mitosis pertama. Dalam proses fertilisasi; inaktivasi MPF yang didahului dengan peningkatan Ca^{2+} didalam sitoplasma, di induksi oleh sperma

Kemampuan etanol mengaktivasi oosit disebabkan oleh kemampuannya memfasilitasi peningkatan ion Ca^{+} di dalam ooplasma yang merupakan tanda bahwa oosit telah teraktivasi (Susko-Parrish *et al.*, 1994). Pelepasan kalsium ke dalam ooplasma penting untuk mengaktifkan reaksi sistemik pada oosit yang bermuara pada penerusan pembelahan meiosis. Etanol menginduksi peningkatan ion kalsium sebagai hasil dari masuknya ion kalsium ekstraseluler dan yang berasal dari tempat penyimpanan intraseluler (Sun *et al.*, 1991), ionomycin secara eksklusif memobilisasi simpanan ion kalsium intraseluler (Hoth *et al.*, 1992). Namun demikian sampai saat ini penelitian tentang induksi partenogenesis menggunakan bahan kimia pada ikan masih sangat sedikit.

Materi dan Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Bio-kimia jurusan kimia dan laboratorium Reproduksi Hewan jurusan Biologi fakultas MIPA Universitas Brawijaya. antara lain:

Pengambilan Oosit

Dari induk ikan Mas punten, sel telur di ambil dengan metode striping. Ikan yang menunjukkan tanda-tanda akan memijah ditangkap dari bak pemeliharaan dan dilakukan pengurutan (*stripping*) untuk mendapatkan telur. Sel Telur ditampung dalam *petridish*.

Hasil dan Pembahasan

Aktivasi

Oosit matang yang peroleh dari hasil stripping

induk betina yang siap memijah dianalisis aktivitas Cdc2 untuk mengetahui tingkat aktivitas MPF sebelum diaktivasi. Tingkat aktivitas oosit matang rata-rata $26,92 \times 10^{-3}$ unit. Pemaparan oosit matang ini pada air yang digunakan sebagai medium perlakuan menyebabkan perubahan aktivitas MPF. Pada menit kedua setelah berada dalam air terjadi peningkatan $27,36 \times 10^{-3}$ unit namun di menit kelima terjadi inaktivasi yang sangat nyata yaitu $25,346 \times 10^{-3}$ unit lebih rendah dibandingkan dengan kondisi ketika oosit baru di stripping.

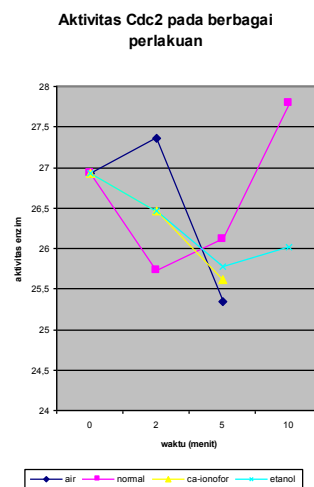
Penggunaan konsentrasi aktivator didasarkan pada hasil terdahulu yang menunjukkan tingkat aktivasi yang tinggi Ca-ionopore $5 \mu\text{M}$ 5 menit dan etanol 7 % 7 menit. Proses aktivasi oosit ditandai oleh adanya proses pembentukan polaritas oosit yaitu terbentuknya kutub animal dan kutub vegetal (tabel 1). Sitoplasma mengalami perubahan dari sitoplasma yang relatif homogen gelap menjadi terang di kutub animal dan vegetal, dan gelap di daerah subekuatorial dekat kutub animal

Pemaparan oosit yang matang pada Ca-ionofor menyebabkan penurunan aktivitas menjadi $26,46 \times 10^{-3}$ unit pada menit kedua dan terus turun dimenit ke lima sampai $25,62 \times 10^{-3}$ unit. Aktivasi oosit dengan etanol pada menit kedua dan kelima yaitu menjadi $26,46 \times 10^{-3}$ unit dan $25,78 \times 10^{-3}$ unit sedangkan pada menit kesepuluh kembali menampilkan peningkatan aktivitas MPF yaitu $26,02 \times 10^{-3}$ unit (gambar 1)

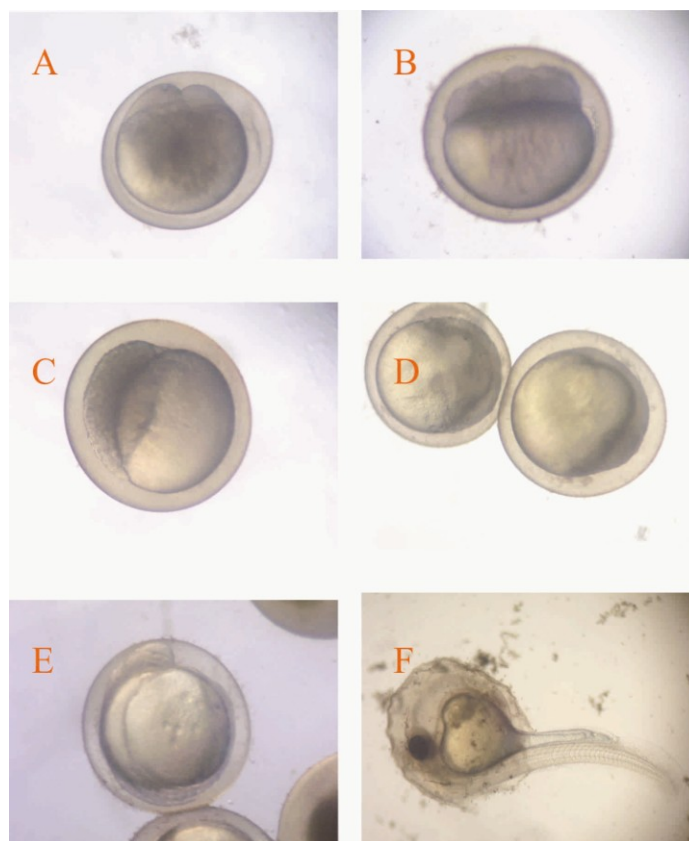
Dari hasil selama penelitian menunjukkan bahwa teknik dan sistem kultur yang dikembangkan telah mampu mendukung perkembangan embrio normal. Sistem kultur dianggap memenuhi syarat untuk perlakuan apabila kontrol mempunyai hatching rate diatas 80 %. Embrio yang mampu berkembang hingga menetas lebih dari 80 % dari jumlah embrio menunjukkan air sebagai medium eksperimen sudah memenuhi syarat untuk proses

Tabel 1. Jumlah oosit yang teraktivasi setelah perlakuan dengan Ca-ionopore atau etanol

Perlakuan		Oosit teraktivasi (%)
Medium aktivasi	Waktu aktivasi (menit)	
Ca –ionopore $5 \mu\text{M}$	5	75,6
Etanol 7 %	7	60,0



Gambar 1. Aktivitas Cd2 pada berbagai perlakuan



Gambar 2. Perkembangan embrio normal. (a) Tahap 2 sel; (b) Tahap 16 sel; (c) Tahap Blastula; (d) Tahap gastrula; (e) Tahap neurula; (f) Tahap menetas

embriogenesis ikan. Tahapan perkembangan embrio normal juga digunakan sebagai pem-

banding untuk perkembangan embrio hasil perlakuan (gambar 2).

Perkembangan aktivitas Cdc 2 setelah diploidisasi

Upaya untuk menekan terpisahnya polar bodi II untuk memperoleh kondisi diploid dengan menggunakan perlakuan DMAP atau sitokalsin setelah aktivasi oosit. Pada perlakuan diketahui bahwa penggunaan DMAP atau sitokalsin dengan konsentrasi yang tinggi menyebabkan kematian oosit yang ditandai dengan pengkerutan.

Usaha mendapatkan embrio yang mampu mencapai tahap perkembangan yang lebih lanjut terus dilakukan dengan perlakuan kombinasi medium aktivator dan diploidisasi, baik konsentrasi medium aktivasi maupun diploidisasi serta lama perendaman oosit dalam kedua medium tersebut.

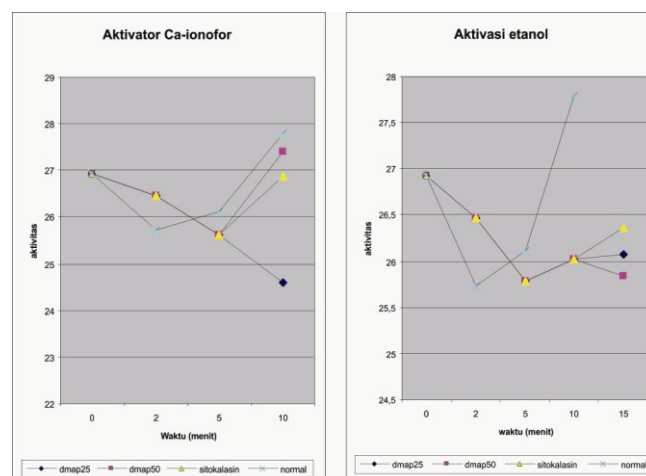
Aktivasi oosit dengan Ca-ionopore 5 μ M 3 atau 5 menit menunjukkan persentasi jumlah oosit yang meningkat. Penurunan konsentrasi DMAP menjadi 100–400 μ M dengan lama perlakuan 5–15 menit menyebabkan oosit tidak mengalami pengkerutan, bahkan embrio mampu berkembang mengalami cleavage hingga pada beberapa perlakuan mencapai tahap blastula. Aktivasi oosit dengan Ca-ionopore 5 μ M 3 menit serta diploidisasi dengan sitokalsin 0,5–0,9 μ g/ml selama 5 menit; Ca-ionopore 5 μ M 5 menit serta diploidisasi dengan sitokalsin 0,5–0,9 μ g/ml selama 5–15 menit juga mampu mendorong proses embriogenesis hingga tahap blastula.

Perlakuan dengan etanol 7% menyebabkan persentasi jumlah oosit teraktivasi lebih banyak daripada perlakuan dengan etanol 6 %. Perlakuan dengan etanol 7% selama 5-7 menit

dapat menyebabkan sebagian besar oosit mengalami aktivasi. Aktivasi oosit dengan etanol 6 % atau 7 % dan diploidisasi dengan sitokalsin 0,5–0,9 μ g/ml selama 7 menit menyebabkan embrio berkembang sampai tahap blastula. Kombinasi perlakuan etanol 7% 5 menit dan DMAP 100–200 μ M 5–10 menit; etanol 7 % 7 menit dan DMAP 100 μ M 5–15 menit; etanol 7% 7 menit dan DMAP 200 μ M 5-10 menit mampu mendukung embrio berkembang menjadi blastula. Tahap blastula tidak tercapai pada kombinasi perlakuan etanol 7% 5 menit dan DMAP 200 μ M; etanol 7% 7 menit dan DMAP 400 μ M 15 menit. Ini mungkin disebabkan konsentrasi DMAP di dalam oosit masih terlalu tinggi karena konsentrasi DMAP medium masih tinggi atau waktu perendaman yang masih lama.

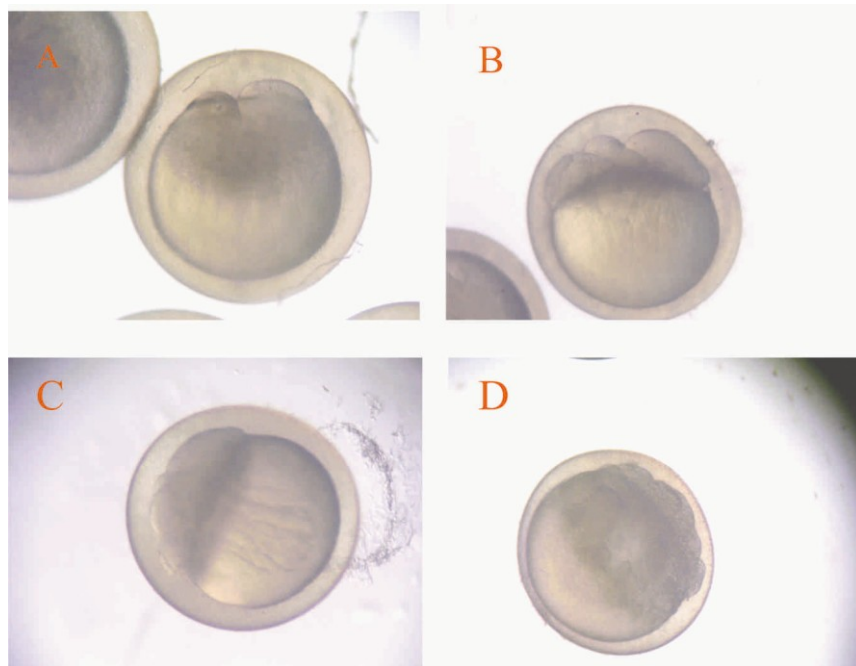
Pada perlakuan dengan menggunakan aktivator Ca-ionofor yang dilanjutkan dengan pemberian DMAP 50 μ M dan Sitokalsin 0,2 μ g/ml menyebabkan peningkatan aktivitas Cdc2 mendekati tingkat aktivitas pada hasil fertilisasi normal. Tingkat aktivitas yang paling mendekati pada pemberian DMAP 50 μ M, sedangkan pemberian DMAP 25 μ M justru menyebabkan aktivitas Cdc2 terus menurun. Hal ini juga tereksprei pada kemampuan pembelahan oosit (Gambar 3a).

Penggunaan etanol 7% selama 7menit yang dilanjutkan dengan pemberian DMAP 50 μ M dan Sitokalsin 0,2 μ g/ml serta DMAP 25 μ M, mengakibatkan peningkatan aktivitas Cdc2. Berbeda dengan yang sebelum diaktivasi dengan



Gambar 3. Aktivitas Cdc2 pada oosit

- aktivasi dengan Ca-ionofor dilanjutkan dengan DMAP serta Sitokalsin
- aktivasi dengan Etanol dilanjutkan dengan DMAP serta Sitokalsin



Gambar 4. Perkembangan embrio partenogenot. (a) Tahap 2 sel; (b) Tahap 8 sel; (c) Tahap 16 sel; (d) Tahap blastula;

Ca-ionofor, justru pada pemberian DMAP 50 μ M peningkatan aktivitas Cdc2 paling rendah. Peningkatan yang tertinggi terjadi pada pemberian Sitokalsin 0,2 μ g/ml selanjutnya DMAP 25 μ M. Namun demikian peningkatan aktivitas akibat aktivasi dengan etanol yang divariasikan dengan DMAP dan Sitokalin tidak ada yang mendekati tingkat aktivitas pada oosit yang difertilisasi dengan spermatozoa (Gambar 3b).

Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah aktivasi pada ikan secara artifisial dengan menggunakan etanol dan calcium ionofor serta diploidisasi dengan menggunakan sitokalsin dan dimetil aminopurin mampu berkembang sampai dengan gastrulasi. Selain itu ketidak mampuan embrio berkembang lebih lanjut, tampaknya dipengaruhi oleh perkembangan pada tahap awal yang berbeda dengan kondisi normal. Hal ini terlihat pada pola yang berbeda pada aktivitas MPF yang dilihat dari tingkat aktivitas Cdc2.

Daftar Pustaka

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.

Collas P., E.J. Sullivan and F.L. Barnes. 1993. Histon H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 224-231

Downs S.M. 1990. Stimulation of parthenogenesis in mouse ovarian follicles by inhibitor of inosine monophosphate dehydrogenase. *Biol Reprod* 43: 427-436.

Gabrielli B.G., L.M. Roy and J.L. Maller. 1993. Requirement for Cdk2 in cytoskeletal mediated metaphase II arrest. *Science*. 259: 1766-1769

Hoth M. and R. Penner. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cell. *Nature* 355: 353-355

Jiang Y.-G., H.X. Yu, B.D. Chen and S.C. Liang. 1983. Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic offspring in *Carassius auratus gibelio*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 8: 1-13

Komen, J., J. Duynhouwer, C.J.J. Richter and E.A. Huisman. 1988. Gynogenesis in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Effects of genetic manipulation of sexual products

- and incubation conditions of eggs. *Aquaculture*, 69: 227-239.
- Komen, J., A.B.J. Bongers, C.J.J. Richter, W.B. van Muiswinkel and E.A. Huisman. 1991. Gynogenesis in common Carp (*Cyprinus carpio* L.): II. The production of homozygous clones and F1 hybrids. *Aquaculture*, 92: 127-142.
- Loi P., S. Ledda, J.Jr. Fulka, P. Cappai and R.M. Moor. 1998. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryo: effect of activation protocols. *Biol Reprod* 58: 1177-1187.
- Nagai T. 1987. Parthenogenetic activation of cattle follicular oocytes *in vitro* with ethanol. *Theriogenology* 37: 869-875
- Novalisa, T., B. Setyono and A.P.M. Marhendra. 2005. Variasi Waktu Perendaman Telur dalam Ethanol 5% dengan Kejutan Panas terhadap Kemampuan Hidup Larva Ikan (*Cyprinus carpio*) Hasil Partenogenesis. F MIPA Biologi Universitas Brawijaya. (Belum dipublikasikan).
- Shapiro H. 1942. Parthenogenetic activation of rabbit eggs. *Nature (Lond)* 149: 304
- Sun F.J., J. Hoyland, X. Huang, W. Mason and R.M. Moor. 1991. A comparison of intracellular change in porcine egg after fertilization and electroactivation. *Development* 115:947-957
- Susko-Parrish J.L., M.L. Liefried-Rutledge, D.L. Northey, V.Schutzkus and N.L. Fisi. 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 M.A.H., S.C. Barton and M.L. Norris. 1986. Nuclear transplantasi in the mouse : hereditary differences between parental genome after activation of the embryonic genome. *Cell* 45: 127-136.
- Susiati, S. B. And A.P.W. Marhendra. 2005. Efek Variasi Konsentrasi Ethanol terhadap Kemampuan Aktivitas Oosit Ikan Mas Punten (*Cyprinus carpio*) secara Partenogenesis. F MIPA Biologi Universitas Brawijaya. (Belum dipublikasikan).
- Taniguchi, N., A. Kijima, T. Tamura, K. Takegami and I. Yamasaki. 1986. Color, growth and Maturation in Ploidy-Manipulated Fancy Carp. *Aquaculture*, 57: 321-328
- Uranga J.A., R.A. Pedersen and J. Arechaga. 1996. Parthenogenetic activation of mouse oocytes using calcium ionophores and protein kinase C stimulator. *J Dev Biol* 40 : 515-519
- Gui J.F. 1989. Evolutionary genetics of unisexual vertebrates. *Nature Journal*, 12: 116-122.
- Gui J.F. 1999. Fish developmental genetics and Artificial propagation. Pp. 41-62 in: Wu C. and Gui J.F. (eds.), *Fish genetics and breeding engineering*. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai.
- Wu C. and J.F. Gui. (eds.), *Fish genetics and breeding engineering*. Shanghai Scientific and Technical Publishers, Shanghai.
- Wu C., Ke H., Chen R. and Ye Y. 1981. Investigation on the carp gynogenesis with reference to establishing a pure line. *Acta Genetica Sinica*, 8, 50-55.
- Yang S.-T. and Gui J.-F. 1999. Isozyme analysis and preliminary confirmation of the genetic markers in two artificial gynogenetic populations of silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*. *Acta Hydrobiologia Sinica*, 23: 264-268.