

© 2004 Thomas Mata Hine
Pengantar Falsafah Sains (PPS 702)
Sekolah Pasca Sarjana (S3)
Institut Pertanian Bogor
Desember, 2004

Posted 9 December 2004

Prof Dr Ir Rudy C Tarumingkeng, M F (Penanggung Jawab)
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto, M.Sc
Dr. Ir. Hardjanto, M.S

KLONING UNTUK MENGHASILKAN HEWAN DENGAN GENOTIP YANG DIINGINKAN

Oleh :

Thomas Mata Hine
B061040021/BRP
tomhin566@bima.ipb.ac.id

I. PENDAHULUAN

Kloning merupakan salah satu bioteknologi mutakhir yang sangat bermanfaat untuk memultiplikasi genotip hewan yang memiliki keunggulan tertentu dan preservasi hewan yang hampir punah. Walaupun keberhasilan produksi hewan kloning lewat transfer inti sel somatik telah dicapai pada berbagai spesies, seperti domba, sapi, mencit, kambing babi, kucing, dan kelinci, efisiensinya sampai sekarang masih sangat rendah yakni kurang dari 1 persen, dengan sekitar 10 persen yang lahir hidup (Han et al., 2003). Transfer inti melibatkan suatu seri prosedur yang kompleks termasuk kultur sel donor, maturasi oosit in vitro, enukleasi, injeksi sel atau inti, fusi, aktivasi, kultur in vitro reconstructed embryo, dan transfer embrio. Jika salah satu dari tahap-tahap ini kurang optimal, produksi embrio atau hewan kloning dapat terpengaruh.

Sejarah tentang hewan kloning telah muncul sejak awal tahun 1900, tetapi contoh hewan kloning baru dapat dihasilkan lewat penelitian Wilmut et al. (1997), dan untuk pertama kali membuktikan bahwa kloning dapat dilakukan pada hewan mamalia dewasa. Hewan kloning tersebut dihasilkan dari inti sel epitel ambing domba dewasa yang dikultur dalam suatu medium, kemudian ditransfer ke dalam ovum domba yang kromosomnya telah dikeluarkan, yang pada akhirnya menghasilkan anak domba kloning yang diberi nama **Dolly**. Kloning domba pertama sebenarnya telah dilaporkan 18 tahun yang lalu oleh Willadson

(1986) yang menggunakan blastomer-blastomer embrio sebagai donor inti. Dan hal inilah yang menjadi *precursor* bagi kegiatan-kegiatan transplantasi inti hewan-hewan domestik termasuk domba Dolly. Produksi domba identik oleh Willadson (1986) mencetuskan berbagai perbaikan dalam teknik-teknik kloning pada berbagai spesies hewan. Hewan-hewan kloning yang dihasilkan dari transplantasi inti sel somatik telah dilaporkan pada mencit, sapi, kambing, domba, dan babi (Wakayama et al., 1998; Kato et al., 1998; Keefer et al., 2000; Wilmut et al., 1997; Polejaeva et al., 2000). Penelitian-penelitian yang melibatkan spesies-spesies lain terus dilakukan, dan dari informasi yang dihimpun menunjukkan bahwa berbagai spesies hewan dapat dikloning lewat transplantasi inti.

Walaupun hewan kloning yang dihasilkan lewat transplantasi inti sangat tidak efisien, fakta bahwa hewan kloning dari berbagai spesies telah diproduksi oleh sejumlah laboratorium menunjukkan begitu besarnya keinginan untuk memproduksi atau mengkloning hewan dengan genotip-genotip spesifik. Disamping itu, ada juga permintaan untuk mengkloning hewan-hewan yang bergenetik unggul; sedangkan keinginan untuk mereplikasi genotip spesifik dari hewan-hewan kesayangan masih bersifat individual. Spesies hewan lainnya yang menjadi target kloning adalah hewan-hewan yang sudah hampir punah, hewan steril, infertile, ataupun hewan mati.

II. TUJUAN PENULISAN

Tujuan penulisan ini adalah untuk mempelajari tingkat keberhasilan kloning pada berbagai spesies hewan, serta faktor-faktor yang mempengaruhinya.

III. PEMBAHASAN

3.1. Keberhasilan Kloning Pada Berbagai Spesies Hewan

Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan kloning adalah spesies. Walaupun pendekatan dasar transplantasi inti adalah sama, material-material spesifik dan metode yang digunakan untuk kloning satu spesies hewan tidak secara otomatis berlaku pada spesies lain. kloning hewan lewat transplantasi inti melibatkan beberapa tahap penting termasuk: 1) penyediaan ovum yang sudah matang, 2) pengeluaran kromosom yang terdapat dalam ovum (enucleation), 3) transfer inti sel hewan yang dikloning ke dalam ovum enuklease, 4) aktivasi embrio yang baru terbentuk sehingga menginisiasi perkembangan embrionik, 5) kultur embrio in vitro, dan 6) transfer embrio yang dikloning ke induk resipien. Teknik-teknik yang diperlukan untuk menyempurnakan tahapan-tahapan ini agak berbeda antara spesies dan juga efisiensi setiap tahap bervariasi antara spesies hewan.

3.1.1. Kloning pada sapi

Jumlah laboratorium yang bekerja pada kloning embrio sapi di seluruh dunia lebih banyak dibandingkan dengan pada spesies lainnya. Keberhasilan sejumlah laboratorium untuk mengkloning sapi disebabkan karena banyaknya program penelitian yang difokuskan pada transfer inti sapi. Maturasi oosit in vitro, fertilisasi in vitro, dan kultur embrio in vitro, telah terlaksana dengan baik pada ternak sapi, dan setiap kegiatan tersebut merupakan tahapan penting dalam proses kloning. Dengan adanya berbagai tahapan kegiatan tersebut menyebabkan sejumlah besar oosit dari rumah potong hewan dapat diakses untuk digunakan dalam penelitian dengan biaya yang relatif rendah. Dan dengan demikian, memberikan cukup percobaan dan cukup embrio yang ditransfer untuk memproduksi kloning pada ternak sapi.

Bervariasinya efisiensi kloning sapi lewat transplantasi inti mungkin disebabkan oleh terbatasnya jumlah eksperimen yang terkontrol, sehingga sulit untuk menentukan penyebab dari variasi yang timbul dan analisis interaksi antara variabel sulit ditentukan. Beberapa penyebab variasi yang mungkin mempengaruhi keberhasilan transplantasi inti adalah genotip, tipe sel donor inti yang digunakan, perlakuan sel donor sebelum transfer inti, sumber ova resipien, teknik-teknik yang dikerjakan, dan laboratorium yang melaksanakan pekerjaan tersebut. Persentase embrio transfer inti yang berkembang menjadi stadium kompak morula atau blastosis sangat bervariasi yakni berkisar antara < 5% hingga > 65%. Tingkat kelahiran hidup per embrio yang ditransfer juga sangat bervariasi yakni berkisar antara 0% hingga 83%, sedangkan tingkat kematian anak berkisar antara 0% - 100% yang terjadi pada minggu pertama setelah lahir (Hill et al., 2000; Wells et al., 1998; Kubota et al., 2000).

Kloning pada ternak sapi juga telah dilakukan oleh Westhusin et al. (2001) dengan menggunakan seekor sapi Brahman jantan yang bernama Chance, yang berumur sekitar 21 tahun. Fibroblast diambil dari biopsi kulit, dikultur dengan metode standar kultur jaringan, kemudian dibekukan dan disimpan dalam nitrogen cair. Ketika transfer inti dilakukan dengan menggunakan sel-sel fibroblast Chance, 28 % dari untaian fusi (53 dari 190) yang dikultur, berkembang menjadi blastosis. 26 blastosis ditransfer ke 11 ekor sapi betina resipien dan menghasilkan 6 kebuntingan, 3 diantaranya mengalami kematian embrio pada hari ke-90 kebuntingan dan hanya 1 ekor yang lahir hidup dan telah bertumbuh menjadi sapi dewasa. Yang menjadi catatan penting bahwa selama minggu pertama setelah lahir, anak sapi tersebut memerlukan monitoring dan terapi yang intensif untuk mengobati *lung dysmaturity* dan *pulmonary hypertension*, termasuk pemberian type 1 insulin-dependent diabetes.

Percobaan kedua dan ketiga menggunakan fibroblast dari biopsi kulit dua ekor sapi betina berumur sedang, satu ekor sapi Brangus dan satu ekor sapi Charolais yang diseleksi berdasarkan performans terbaik. Setelah transfer inti dan kultur, jumlah embrio yang berkembang hingga stadium blastosis adalah 16%. 37 blastosis Charolais ditransfer ke 13 resipien. Lewat pemeriksaan kebuntingan pada hari ke-30 ternyata 6 diantaranya dinyatakan bunting, tetapi hanya 4 ekor yang dapat mempertahankan kebuntingannya hingga hari ke-60. Dari keempat ekor induk sapi tersebut, salah satu diantaranya mengalami keguguran, dua ekor digunakan untuk tujuan penelitian (fetusnya dikeluarkan) dan satu ekor menghasilkan anak betina kembar dua yang kemudian keduanya mati setelah berumur 7 sampai 10 hari. 43 blastosis yang berasal dari sapi Brangus ditransfer ke 14 resipien dan menghasilkan 3 kebuntingan, tetapi tidak ada yang bertahan hidup melewati hari ke-90 kebuntingan (Westhusin et al., 2001).

Pada percobaan lain, Feng et al. (1996) menggunakan fibroblast sapi Black Angus jantan yang secara genetik resistant terhadap brucellosis. Sapi tersebut mati dan tidak ada semen beku yang tersedia untuk menghasilkan keturunan baru. Dari pasangan oosit-fibroblast yang berdifusi dan dikultur, 44% berkembang menjadi blastosis. 39 blastosis ditransfer ke 20 resipien dan menghasilkan 10 kebuntingan ketika dilakukan pemeriksaan pada hari ke-35, dua diantaranya bertahan hingga hari ke-130 dan ke-250 kebuntingan.

3.1.2. Kloning pada domba

Walaupun mamalia pertama yang dikloning dari sel-sel somatik adalah domba, namun setelah itu tidak ada domba lagi yang dilaporkan sebagai hasil transfer inti menggunakan inti sel somatik domba dewasa. Hal ini mungkin disebabkan oleh karena banyak peneliti yang lebih tertarik untuk memproduksi hewan *transgenic* dan lebih suka menggunakan sel-sel fetus dibandingkan sel-sel somatik hewan dewasa. Teknik yang digunakan untuk mengkloning domba adalah sama dengan yang dilaporkan pada sapi, tetapi dengan suatu pengecualian yakni kebanyakan peneliti domba telah menggunakan oosit yang matang *in vivo*. Efisiensi kloning domba sama dengan sapi dalam hal produksi embrio kloning dan tingkat kelahiran hidup (Campbell et al., 1996). Masalah lain yang timbul pada kloning domba adalah terjadinya keguguran fetus selama kebuntingan dan abnormalitas anak yang dilahirkan cukup tinggi.

3.1.3. Kloning pada kambing

Kambing Kloning telah dihasilkan dengan menggunakan sel-sel somatik hewan dewasa dan sel-sel fetus sebagai donor inti untuk transplantasi ke dalam ovum enuklease (Baguisi et al., 1999). Seperti pada domba, kebanyakan peneliti telah menggunakan sel-sel fetus untuk memproduksi keturunan transgenic. Teknik kloning kambing sama dengan yang digunakan pada domba dan sapi, dimana ovum resipien diperoleh dari oosit yang dimatangkan secara *in vitro* dan *in vivo*. Setelah dikultur selama satu hingga dua hari, embrio ditransfer ke betina resipien pada stadium 2 – 4 sel. Walaupun tingkat kelahiran hidup sama dengan sapi dan domba, tetapi tingkat abnormalitas dan kematian baik pada fetus maupun anak yang lahir tidak sama.

3.1.4. Kloning pada mencit

Awalnya, kloning mencit terlihat lebih sulit dilaksanakan dibandingkan dengan sapi, domba dan kambing, dengan tingkat kelahiran hidup hanya sekitar satu persen. dari embrio yang ditransfer dapat lahir hidup (Ogura et al., 2000). Penyebab rendahnya tingkat kelahiran tersebut belum diketahui secara jelas, apakah karena pengaruh spesies, teknik yang dikerjakan atau hal lainnya belum jelas. Teknik transfer inti yang umum dikerjakan pada spesies lain meliputi electrofusi ovum resipien dengan inti sel donor. Mencit kloning pertama dihasilkan lewat injeksi langsung inti sel. Metode injeksi langsung telah secara kontinyu digunakan sebagai metode yang umum untuk penelitian pada mencit. Metode terbaru yang lebih efisien untuk kloning mencit telah dilakukan oleh Baguisi dan overstrom (2000) dengan menggunakan metode enuclease kimiawi yang dikombinasikan dengan injeksi langsung inti donor untuk menghasilkan anak yang hidup. Metode-metode baru ini memerlukan percobaan tambahan pada spesies lain untuk menentukan efektivitasnya.

3.1.5. Kloning pada babi

Seperti pada mencit, produksi babi kloning sangat sulit dan tidak efisien dengan dengan daya hidup embrio yang ditransfer hanya sekitar satu persen. Dalam tulisan ini, ada dua percobaan kloning babi yang telah menghasilkan anak yang hidup. Pada laporan pertama oleh Polejaeva et al. (2000), kegiatan transfer inti pertama dilaksanakan dengan mengoleksi ovum yang matang *in vivo* dan dileburkan dengan sel-sel granulosa yang matang untuk menghasilkan embrio transfer inti. Hari berikutnya, kegiatan transfer inti kedua dilakukan dengan menggantikan dua pronukleus yang ada dalam zygot hasil fertilisasi

normal dengan *pseudo-pronuclei* yang diambil dari embrio hasil transfer inti. Embrio kemudian ditransfer ke betina resipien dalam dua jam setelah pelaksanaan transfer inti yang kedua. Sebanyak 401 embrio transfer inti ganda ditransfer ke tujuh resipien, dan 185 embrio transfer inti tunggal ditransfer ke tiga resipien. Dari hasil percobaan ini menunjukkan bahwa hanya satu resipien yang mendapat transplantasi inti menjadi bunting dan melahirkan 5 ekor anak. Pada laporan kedua oleh Onishi et al. (2000), inti fibroblast fetus diinjeksi ke dalam oosit matang *in vivo*, kemudian embrio yang dihasilkan ditransfer ke dalam oviduct betina resipien setelah kultur jangka pendek. Hanya satu ekor anak babi betina yang lahir dari hasil transfer 110 embrio kloning ke empat betina resipien.

3.1.6. Kloning pada spesies lain

Walaupun produksi hewan kloning lewat transfer inti sel-sel somatik telah dilaporkan pada beberapa spesies terdahulu, masih ada sejumlah spesies lain yang dikloning dan masih terus diteliti. Spesies-spesies tersebut termasuk kucing, anjing, kuda, kelinci, tikus, dan beberapa hewan buas. Di antara hewan-hewan tersebut, kloning anjing menjadi fokus penelitian dari salah satu laboratorium di Texas. Anjing merupakan hewan yang unik dan menantang untuk diteliti karena banyak mekanisme yang mengontrol reproduksi belum dimengerti dengan baik. Teknik-teknik reproduksi yang *repeatable* dan efisien pada anjing seperti teknik superovulasi, sinkronisasi estrus, produksi embrio *in vitro*, belum biasa dilaksanakan. Salah satu penghambat kemajuan kloning anjing adalah terbatasnya persediaan ovum yang matang untuk digunakan sebagai resipien transfer inti. Disisi lain, upaya mengembangkan metode yang *repeatable* untuk menghasilkan oosit yang dimatangkan *in vitro* yang dikoleksi dari anjing anestrus memiliki tingkat keberhasilan yang sangat rendah. Oleh karena itu, seperti pada babi, mereka berupaya menggunakan ovum yang matang *in vivo*.

Untuk memperoleh ovum yang matang *in vivo*, serangkaian kegiatan dilaksanakan, yang dimulai dengan menentukan saat ovulasi pada anjing lewat observasi visual untuk mendeteksi proestrus dan *vaginal cytology* untuk mendeteksi estrus, pengukuran kadar *luteonizing hormone* (LH) serum untuk mendeteksi LH *surge*, dan uji progesterone untuk mengkonfirmasi validitas LH *surge*. Setelah ovulasi, ovum dikoleksi dengan teknik pembedahan dengan memflushing oviduct dengan medium koleksi embrio (TL Hepes solution). Ovum yang berada pada metaphase II yang ditandai oleh adanya polarbody diseleksi dan digunakan untuk transfer inti. Dari 17 koleksi diperoleh 109 oosit (6,4 per donor) tetapi hanya 63 (3,7 per donor) yang memiliki kualitas yang layak untuk transfer inti.

61 dari oosit tersebut dienucleate dan 43 berhasil berdifusi dengan inti sel anjing dewasa. Setelah electrofuse, ovum anjing diaktifkan dengan menempatkannya ke dalam medium fusi yang ada dalam *electrofusion chamber* dan kemudian menggunakan *electrical pulse* seperti yang digambarkan oleh Kato et al. (1998). Selanjutnya diinkubasi selama lima jam dalam 10 µg/ml *cycloheximide* (Sigma) dan 5 µg/ml *cytochalasin B* (Sigma). Pasangan fusi kemudian dicuci tiga kali dan ditempatkan dalam *system co-cultur B2-vero cell monolayer* selama dua sampai tiga hari dalam 5% CO₂ pada suhu 39°C. Jumlah embrio yang membelah adalah 10 embrio, lima diantaranya ditransfer ke tiga ekor anjing betina resipien tetapi tidak ada yang berhasil bunting (Westhusin et al., 2000).

3.2. Variasi Efisiensi Kloning : Efek Tipe Sel Donor Inti

Spesies hanyalah merupakan salah satu variabel yang mempengaruhi tingkat keberhasilan kloning untuk mereproduksi genotip yang spesifik. Variable lainnya yang berpengaruh adalah tipe sel donor yang digunakan untuk nuclear transfer. Dalam kasus dimana hewan dewasa dijadikan target untuk kloning, sel-sel yang tersedia untuk digunakan sebagai donor inti mungkin terbatas. Sebagai contoh, sel-sel granulosa dapat dengan mudah dihasilkan dari sapi betina lewat aspirasi folikel dengan bantuan alat ultrasound; sebaliknya, untuk menghasilkan sel-sel granulosa dari kucing atau anjing memerlukan lebih banyak prosedur invasive. Bagaimanapun, penggunaan tipe-tipe sel tertentu (sel granulosa, sel cumulus, sel uterus, dan sel oviduct) dari kucing dan anjing mungkin tidak tersedia kalau hewan tersebut sudah mandul.

Banyak tipe sel yang telah digunakan sebagai donor untuk transfer inti. Oleh karena kurangnya eksperimen yang terkontrol dan terdapat banyak variable yang mempengaruhi efisiensi kloning, maka pengaruh tipe sel menjadi tidak jelas. Walaupun demikian, ada suatu indikasi bahwa tipe sel dan stadium siklus sel donor pada saat transfer inti (metaphase terhenti atau bersamaan dengan aktivasi ooplasma) dapat mempengaruhi efisiensi kloning, dengan stadium G0/G1 menjadi stadium terbaik.

3.2.1. Sel Donor Embrio

Blastomer embrio merupakan tipe sel pertama yang digunakan untuk memproduksi anak hasil transfer inti pada mamalia. Wiladson (1986) melaporkan produksi anak domba hasil transfer inti dari embrio stadium 8 – 16 sel ke dalam ovum resipien enucleate. Setelah percobaan tersebut, banyak eksperimen yang diadakan dengan menduplikasi prosedur fusi blastomer ke oosit atau zygote enuklease pada sapi, kambing, babi, kelinci dan mencit. Setelah blastomer berdifusi dengan sitoplasma, inti sel yang akan ditransfer direprogramkan secara efektif untuk menghasilkan tingkat produksi embrio yang tinggi. Dari embrio-embrio

yang ditransfer, diperoleh angka kebuntingan sekitar 25% - 35%. Tidak seperti kloning dengan sel-sel somatik (fetus atau hewan dewasa), sebagian besar dari kebuntingan tersebut dapat dipertahankan. Selain memiliki ukuran tubuh yang lebih besar pada saat lahir, anak hasil kloning yang dihasilkan dari blastomer embrio (sebagai donor inti) memiliki tingkat kematian dan abnormalitas yang rendah. Salah satu kelemahan dari penggunaan embrio sebagai donor inti adalah terbatasnya jumlah sel yang tersedia untuk kloning, dengan mengurangi kemungkinan untuk menghasilkan anak kloning dalam jumlah besar per genotip.

Walaupun blastomer-blastomer embrio telah secara sukses menghasilkan kelahiran hidup, penggunaan inner cell mass (ICM) dan tropektoderm sebagai donor inti terlihat kurang efisien. Fusi atau injeksi ICM ke dalam oosit enuklease hanya menghasilkan 5 sampai 7 % blastosis yang terbentuk dan setelah transfer ke betina resipien hanya kurang dari 1% yang lahir hidup (Keefe et al., 1994). ICM dan tropektoderm juga telah digunakan sebagai donor inti dalam eksperimen kloning mencit. Penggunaan sel-sel ICM dan tropektoderm mengindikasikan bahwa sitoplasma enuklease mampu mereprogramkan sel-sel yang sudah berdiferensiasi. Bagaimanapun, tipe sel-sel ini masih memberikan kegunaan yang terbatas sebagai suatu metode untuk menghasilkan sejumlah besar anak kloning.

Kultur stem cell dan primordial germ cell embrio mencit telah menimbulkan ide untuk menggunakan kedua tipe sel tersebut sebagai sumber inti donor. Wakayama, et al. (1999) secara sukses menggunakan dua stem cell embrio mencit yang berbeda untuk memproduksi anak kloning. Pada mencit, hasil dengan stem cell embrio sama dengan eksperimen sebelumnya menggunakan sel-sel somatik (masing-masing yakni 2,4% vs 1,2%). Keberhasilan penggunaan stem cell memungkinkan kultur jangka panjang dan modifikasi genotip sebelum kloning. Kemajuan ini sangat besar, tetapi masih kurang efisien untuk memproduksi anak kloning dalam jumlah besar.

Campbell et al. (1996) untuk pertama kali mempublikasikan laporan penggunaan *embryonic disc cell* sebagai karyoplast dalam eksperimen transfer inti. Rataan *lambing rate* yang dihasilkan pada eksperimen ini adalah dua persen. Tiga dari lima ekor anak domba yang lahir hidup mengalami kematian sesaat setelah lahir. Wells et al. (1997) secara efektif berhasil mengulangi eksperimen ini. Cell line dari embrio domba dikultur selama 6 – 18 passage. Setelah itu diikuti starvasi serum untuk mengaktifkan sel-sel donor. 75 dari 386 embrio berkembang ke stadium blastosis in vitro, dan 2 dari 37 resipien (5%) menjadi bunting. Walaupun masih belum efisien, sel-sel embrio yang dikultur ini mampu berkembang hingga periode fetus.

3.2.2. Sel Donor Somatik

Berbagai tipe sel somatik yang telah digunakan sebagai donor untuk transfer inti telah menghasilkan kelahiran hidup (Colman, 2000). Fibroblast fetus sapi telah digunakan sebagai donor inti secara luas disebabkan karena sel-sel ini dapat bertumbuh dengan cepat dan sifatnya stabil dalam kultur. Sel-sel ini dapat dipanen dengan mudah dari fetus pada umur kebuntingan 40 – 60 hari. Di bawah kondisi kultur standar, populasi sel dapat mencapai dua kali lipat setelah dikultur selama 17 sampai 24 jam, bahkan dapat mencapai 60 kali lipat sebelum mencapai senescence. Sekitar 0,5 – 2% dari embrio hasil transfer inti fetal fibroblast domba, sapi, kambing dan babi dapat berkembang hingga kelahiran hidup. Walaupun fetal fibroblast memiliki jumlah penggandaan sel potensial yang terbatas dalam kultur *in vitro*, kloning dari senescent fibroblast untuk menghasilkan fetus kloning menyebabkan pembentukan kembali telomere.

Memang kebanyakan tipe sel yang digunakan berasal dari hewan dewasa. Laporan pertama kloning dari sel-sel dewasa melibatkan sel-sel epitel ambing yang berasal dari domba (Wilmot et al., 1997). Walaupun, belum ada laporan lagi tentang penggunaan berbagai tipe sel domba dewasa, sapi telah dihasilkan dari sel-sel ambing dalam cara yang sama (Zakhartchenko et al., 1999). Sel-sel somatik dewasa dan berbagai tipe jaringan dari banyak spesies lain juga telah digunakan untuk produksi anak kloning.

Dermal fibroblast merupakan sumber yang paling umum digunakan sebagai sel donor. Sel-sel ini mudah dipanen dari kedua jenis kelamin dan dikultur menggunakan kondisi kultur jaringan standar. Setelah transfer inti, yang berkembang hingga stadium blastosis berkisar antara 21 hingga 60% (Kubota, et al., 2000; Hill et al., 2000) Tingkat pertumbuhan yang cenderung rendah dari fibroblast yang dimatangkan dalam kultur, mayoritas dari sel-sel tersebut berada pada fase G0/G1 dari siklus sel pada saat diberikan. Dengan demikian kebutuhan untuk menginduksi quiescence pada dermal fibroblast matang menjadi berkurang (Hill et al., 2000; Kato et al., 1998). Setelah ditransfer ke betina resipien, embrio transfer inti dari sel-sel dermal mampu berkembang menjadi anak sapi hidup. Bagaimanapun, tingkat perkembangan masih rendah yakni hanya 1 – 5% dari embrio yang dikultur yang berhasil lahir dalam keadaan hidup. Sumber fibroblast lain juga telah digunakan. Shiga et al. (1999), menggunakan fibroblast dari jaringan otot sapi sebagai karyoplast. Secara keseluruhan, sekitar 4% dari embrio transfer inti dapat berkembang, dan 3 dari 4 anak sapi yang lahir, mati sesaat setelah lahir. Ogura et al. (2000); Wakayama dan Yanagimachi (1999) menggunakan fibroblast dari ujung ekor mencit, dan setelah itu electofuse atau injeksi karyoplast-karyoplast ini ke dalam enucleated oocytes. Hanya 1 – 2% embrio transfer inti yang berhasil lahir.

Sel-sel cumulus dan mural granulose juga telah digunakan secara luas sebagai karyoplast untuk transfer inti pada sapi, mencit, kambing dan babi (Wells et al., 1998; Kato et al., 1998; Wakayama et al., 1998; Keefer et al., 2000; Polejaeva et al., 2000). Wells et al.

(1998) telah memproduksi anak sapi kloning dengan menggunakan sel-sel quiescent mural granulose sebagai donor nuclear. Sekitar 27.5% dari embrio yang dikultur berhasil berkembang menjadi blastosis, dan hanya 10% dari blastosis tersebut yang lahir hidup setelah transfer, atau sekitar 2,8% dari embrio kloning yang survive. Kato et al. (1998) melaporkan bahwa 41% dan 17,3% dari embrio transfer inti yang direkonstruksi dari sel-sel cumulus dan sel-sel oviduct, masing-masing bertumbuh menjadi anak yang lahir hidup. Data-data ini sudah diulang, dan mengindikasikan kemungkinan perbaikan potensi perkembangan dari embrio transfer inti. Sel-sel cumulus yang diinjeksi ke dalam oosit mencit enuclease menstimulasi tingkat perkembangan embrio yang tinggi, tetapi setelah transfer ke resipien hanya sekitar 0,9% yang berkembang (Wakayama et al., 1998). Hasil penelitian lain pada kambing menunjukkan bahwa 2% - 13% cloned embryo yang berasal dari sel-sel granulosa-cumulus kambing menghasilkan anak hidup (Keefer et al., 2000); sedangkan Polejaeva et al. (2000) melaporkan bahwa hanya 1,2 % cloned embryo babi yang berasal dari sel-sel granulose yang bertahan hidup. Penting dicatat bahwa laporan yang paling pertama yang menggunakan sel-sel granulose sebagai karyoplast dilakukan oleh Collas dan Barnes, 1994.

Studi terbaru mengindikasikan bahwa sel-sel sertoli yang belum matang mampu menunjang perkembangan embrio kloning pada tikus. Ogura et al. (2000) menggunakan sel-sel sertoli segar atau yang dikultur yang berasal dari testis mencit immature sebagai karyoplast. Sekitar 2,5% dari embrio tersebut berhasil berkembang.

Tanpa melihat tipe sel yang digunakan, jumlah embrio kloning yang mampu bertahan hingga kelahiran hidup masi rendah yakni kurang dari 3 persen. Dan yang lebih mengherankan adalah data-data tersebut tidak terlalu bervariasi antar tipe sel yang digunakan sebagai karyoplast. Hal ini menunjukkan bahwa yang paling berpengaruh terhadap keberhasilan kloning adalah teknik transfer inti dengan memasukan inti sel somatik ke dalam sitoplasma oosit. Penelitian lanjutan harus dititikberatkan pada pengaruh tipe sel donor dan kondisi kultur sel terhadap efisiensi produksi kloning lewat transfer inti.

3.3. Variasi Efisiensi Kloning : Pengaruh Modifikasi Genetik

Seperti yang didiskusikan sebelumnya, efisiensi kloning tidak hanya dipengaruhi oleh spesies tetapi juga dipengaruhi oleh tipe sel. Dalam kenyataannya, banyak genotip yang ditargetkan untuk kloning sudah dimodifikasi secara genetic. Pada umumnya, sel-sel somatik dikoleksi dan dikultur untuk menghasilkan sufficient cell, dan sel-sel ditransfeksi secara genetic dengan elektroporasi atau transformasi liposome. Setelah penambahan DNA, sel-sel seleksi untuk diferensiasi transfected cells vs non-transfected cells. Seleksi ini dapat berakhir antara 3 hingga 12 hari. Setelah seleksi, coloni hidup ditumbuhkan hingga jumlah selnya cukup untuk passage, pembekuan, dan/atau analisis DNA. Pada poin ini, sel-sel disimpan hingga analisis DNA dapat mengidentifikasi line yang mengandung event yang diinginkan.

Walaupun mungkin ada beberapa modifikasi terhadap prosedur ini, namun secara umum, semua sel transgenic mengalami seleksi dan tingkat ekspansi tertentu sebelum digunakan untuk tujuan kloning.

Ada dua variable yang dimasukkan dalam prosedur yang baru saja digambarkan yakni cell passage dan seleksi kimiawi. Sementara tidak ada analisis yang detail pada pengaruh seleksi kimiawi terhadap clonabilitas sel-sel somatik yang telah dikerjakan, eksperimen sebelumnya dengan stem cell embryo mencit mengindikasikan bahwa kebanyakan sistem seleksi kimiawi, seperti sistem-sistem yang didasarkan pada neomycin dan puromycin, tidak terlihat memiliki efek yang mengganggu terhadap sel. Pengaruh negatif dari transgenic adalah peningkatan dalam jumlah *cell passage* yang diperlukan untuk mengidentifikasi sel-sel yang dimodifikasi secara tepat sebelum kloning. Untuk saat ini, tipe sel yang lebih baik adalah fibroblast fetus. Sel-sel ini dapat dikoleksi dalam jumlah yang banyak, dan mampu mengalami sejumlah pembelahan sel sebelum mengalami senescence. Keunggulan lainnya dari fibroblast fetus adalah dapat dimanipulasi dengan mudah secara genetic dengan elektroporasi atau lipofeksi.

Sekalipun fibroblast fetus dapat mereplikasi dengan baik dalam kultur dan menghasilkan transgenic colonies dengan efisiensi yang tinggi, perbedaan clonal yang nyata antara transgenic lines yang dihasilkan oleh original cell line atau fetus yang sama dapat diidentifikasi. Hasil penelitian Schniecke et al. (1997) merupakan contoh yang baik tentang efek potensial genetic transfection terhadap efisiensi kloning. Walaupun jumlahnya kecil sehingga membuat interpretasi menjadi sulit, mereka mengamati suatu penurunan efisiensi kloning antara sel nontransgenic (kontrol) yang digunakan pada passage 2 – 3 (20% anak domba hidup) dan sel transgenic yang digunakan pada passage 5 -7 (13,6%) atau 7 - 9 (10,5% dan 4,8%). Persentase anak hidup diekspresikan sebagai persentase anak domba per embryo yang ditransfer. Ketika *cell line* yang sama digunakan untuk eksperimen target gen yang memerlukan analisis DNA yang lebih kompleks, efisiensi kloning menjadi lebih rendah yakni 7,1 persen, 2,3 persen, 0 persen, dan 5,2 persen untuk empat clone yang diuji (McCreath et al., 2000).

Perbedaan *clonal* yang disebabkan karena peningkatan jumlah passage mungkin ada hubungannya dengan instabilitas kromosom akibat pemendekan telomere dan mungkin juga akibat rekombinasi mitosis. Penelitian sebelumnya mendemonstrasikan suatu korelasi nyata antara panjang telomere dan instabilitas kromosom, dimana tingkat *rearrangement* kromosom yang tinggi akan menyebabkan penurunan panjang telomere (Hande et al., 1999). Ketika pemendekan telomere diidentifikasi sebagai salah satu penyebab utama senescence dalam kultur sel-sel somatik, setiap passage sel mengalami pemendekan telomere hingga titik dimana panjang telomere tidak cukup untuk mempertahankan stabilitas kromosom. Pada titik ini *rearrangements* akan terjadi (Hande et al., 1999). Dengan demikian, ketika menghasilkan *transgenic cell line*, peningkatan jumlah passage yang diperlukan untuk

mengintroduksi penyimpangan kromosom pada beberapa *clonal cell line*, akan menyebabkan rendahnya frekwensi keberhasilan kloning dari sel-sel tersebut. Setiap *clonal cell line* memiliki perbedaan proporsi sel yang membawa kromosom abnormal, yang tergantung pada jumlah passage. Kejadian pertama menghasilkan sejumlah besar proporsi sel dengan abnormalitas kromosom.

Sementara pengaruh jumlah passage terhadap clonabilitas sel dapat menjelaskan tentang peningkatan abnormalitas kromosom akibat pemendekan telomere, perbedaan clonal antara sel-sel transgenic yang telah mengalami jumlah passage yang sama lebih sulit untuk dijelaskan. Salah satu kemungkinannya adalah *loss of heterozygosity* (LOH) yang disebabkan karena rekombinasi mitosis, konversi gen, mutasi atau kehilangan kromosom. LOH akan menghasilkan *deleterious recessive allele* dan menimbulkan suatu frekwensi kloning yang rendah. Walaupun semua mekanisme yang disebutkan di atas dapat menyebabkan LOH, data terbaru menunjukkan bahwa rekombinasi mitosis pada sel-sel somatik (fibroblast) menyebabkan 88% dari kejadian LOH pada suatu uji loci spesifik (Shao et al., 1999). Hal ini dapat menjelaskan mengapa derivat-derivat dari *clonal cell line* yang sama dan jumlah *passage* yang sama memiliki respek yang berbeda terhadap efisiensi kloning. Itu merupakan proses rekombinasi mitosis yang secara random menghasilkan tingkat dan tipe (bagian) LOH yang berbeda sepanjang kromosom, beberapa diantaranya tidak memiliki efek terhadap viabilitas sel atau kloning, dan lainnya akan memiliki efek yang signifikan. Ketika instabilitas cromosom dihubungkan dengan pemendekan telomere, masalah-masalah yang dihubungkan dengan rekombinasi mitosis akan lebih buruk dalam sel yang telah mengalami sejumlah besar pembelahan mitosis.

Pendek kata, proses transfeksi genetic dari sel-sel somatik yang dipersiapkan sebagai nuclear donor akan menurunkan efisiensi kloning akibat jumlah passage yang tinggi. Beberapa dari masalah ini mungkin diatasi oleh penggunaan sel-sel yang telomernya tidak mengalami pemendekkan seperti stem cells, dengan aktivasi buatan dari gen telomerase, dan atau oleh penggunaan sel-sel yang memiliki tingkat rekombinasi mitosis yang rendah.

IV. PENUTUP

Walaupun pada kenyataannya bahwa hewan kloning yang berasal dari sel-sel somatik telah berhasil diproduksi pada berbagai spesies hewan (domba, sapi, kambing, babi, kelinci dan mencit), masih banyak masalah yang belum terpecahkan dengan bioteknologi ini. Transfer inti sel somatik menunjukkan beberapa penyimpangan perkembangan, termasuk tingginya angka abortus selama kebuntingan awal dan meningkatnya angka kematian anak setelah lahir. Produksi hewan kloning masih sangat rendah dengan tingkat efisiensi kurang dari 1% dan hanya sekitar 10 persen yang lahir hidup. Walaupun demikian, keberhasilan mengkloning berbagai spesies hewan oleh sejumlah laboratorium telah menimbulkan minat dalam mereproduksi hewan dengan genotip yang diinginkan. Selain itu, terjadi peningkatan permintaan untuk mengkloning hewan-hewan yang memiliki keunggulan genetik, hewan-hewan kesayangan, dan spesies hewan yang hampir punah. Ada beberapa variabel yang mempengaruhi tingkat keberhasilan kloning diantaranya adalah spesies, tipe sel donor inti, modifikasi genetik, ovum resipien, perlakuan terhadap sel-sel donor sebelum transfer inti, dan teknik transfer inti.

DAFTAR PUSTAKA

- Baguisi, A., E. Behboodi, D.T. Melican, J.S. Pollock, M.M. Destrempe, C. Commuso, J.J. Williams, S.D. Nims, C.A. Porter, P. Midura, M.J. Palacios, S.L. Ayres, R.S. Denniston, M.L. Hayes, C.A. Ziomek, H.M. Meade, R.A. Godke, W.G. Gavin, E.W. Overstrom, and Y. Echelard. 1999. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnology*, 17 : 456 – 461.
- Baguisi, A., and E.W. Overstrom. 2000. Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology*, 53 : 209.
- Campbell, K.H., J. McWhir, W.A. Ritchie, and I. Wilmut. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380 : 64 – 66.
- Collas, P. and F. Barnes. 1994. Transplantasi inti by microinjection of inner cell mass and granulose cell nuclei. *Molecular Reproduction and Development*. 38 : 264 – 267.
- Collman, A. 2000. somatic cell nuclear transfer in mammals : progress and applications. *Kloning*, 1 : 185 – 200.
- Feng, J., Y. Li, M. Hashad, E. Schurr, P. Gross, L.J. Adams, and J.W. Templeton. 1996. Bovine natural disease resistance associated macrophage protein (NRAMP1) gene. *Genome Research*, 6 : 956 -964.

- Han, Y.M., Y.K. Kang, D.B. Koo, K.K. Lee. 2003. Nuclear reprogramming of cloned embryos produced in vitro. *Theriogenology*, 59 : 33 – 44.
- Hande, M.P., E. Samper, P. Lasdorp, M.A. Blasco. 1999. Telomere length dynamic and chromosomal instability in cells derived from telomere null mice. *The Journal of Cell Biology*, 144 : 589 – 601.
- Hill, J.R., Q.A. Winger, C.R. Long, C.R. Looney, J.A. Thompson, M.E. Westhusin. 2000. Development rates of male bovine nuclear transfer embryos derived from adult and fetal cells. *Biology of Reproduction*, 62 : 1135 – 1140.
- Kato, Y., T. Tani, Y. Sotomaru, K. Kurokawa, J. Kato, H. Doguchi, H. Yasue, and Y. Tsunoda. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 282 : 2095 -2098.
- Keefer, C.L., S.L. Stice, D.L. Mathews. 1994. Bovine inner cell mass as donor nuclei in the production of nuclear transfer embryos and calves. *Biology of Reproduction*, 50 : 9935 – 9939.
- Keefer, C.L., R. Keyston, B. Bhatia, A. Lazaris, I. Begin, N. Kafidi, A. Bilodeau, B. Wang, T. Tao, D. Laurin, F.J. Zhou, B.R. Downey, H. Baldassarre, and C.N. Karatzas. 2000. Efficient production of viable goat offspring following nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol. Reprod Suppl.* 1, 62 : 192.
- Kubota, C., H. Yamakuchi, J. Todoroki, K. Mizoshita, N. Tabara, M. Barber, and X. Yang. 2000. Six cloned calves produced from adult fibroblast cell after long-term culture. *PNAS*, 97 : 990 – 995.
- McCreath, K.J., J. Howcroft, K.H. Campbell, A. Colman, A.E. Scheike, and A.J. Kind. 2000. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*, 405 : 1066 – 1069.
- Ogura, A., K. Inoune, N. Ogunuki, A. Noguchi, K. Takano, R. Nagano, O. Suzuki, J. Lee, F. Ishino, and J. Matsuda. 2000. Production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature sertoli cells. *Biol. of Reprod*, 62 : 1579 – 1584.
- Ogura, A., K. Inoue, K. Takano, T. Wakayama, and R. Yamagimachi. 2000. Birth of mice after transfer by electrofusion using tail tip cells. *Mol Reprod Dev*, 57 : 55 -59.
- Onishi, A., M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada, and A.C.F. Perry. 2000. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science*, 289 : 1188 – 1190.
- Polejaeva, I.A., S. Chen, T. Vaught, R. Page, J. Mullins, S. Ball, Y. Dal, J. Boone, S. Walker, D. Ayatres, A. Colman, and K. Campbell. 2000. Cloned pig produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 407 : 86 -90.

- Schnieke, A.E., A.J. Kind, W.A. Ritchie, K. Mycock, A.R. Scott, M. Ritchie, I. Wilmut, A. Colman, and K.H. Campbell. 1997. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*, 278 : 2130 – 2133.
- Shao, C., L. Deng, O. Henegariu, L. Liang, N. Raikwar, A. Sohota, P.J. Stambrook, and J.A. Tischfield. 1999. Mitotic recombination produces the majority of recessive fibroblast variants in heterozygous mice. *Proc Natl Acad Sci.*, 96 : 9230 – 9235.
- Shiga, K., T. Fujita, K. Hirose, Y. Sasae, and T. Nagai. 1999. Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cell obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology*, 52 : 527 – 535.
- Wakayama, T., A.C. Perry, M. Zuccotti, K.R. Johnson, and R. Yanagimachi. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 394 : 369 – 374.
- Wakayama, T., I. Rodriguez, A. Perry, R. Yanagimachi, and P. Mombaerth. 1999. Mice cloned from embryonic stem cells. *PNAS*, 96 : 14984 – 14989.
- Wakayama, T., and R. Yanagimachi. 1999. Cloning of male mice from adult tail-tip cells. *Nat Genet*, 22 : 127 – 128.
- Wells, D., T. Misica, T. Misica, A. Day, and R. Tervit. 1997. Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: A comparison between in vivo-matured cytoplasm. *57* : 385 – 393.
- Wells, D., T. Misica, T. Misica, A. Day, and R. Tervit. 1998. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Bio of Reprod*, 60 : 996 -1005.
- Westhusin, M.E., C.R. Long, T. Shin, J.R. Hill, C.R. Looney, J.H. Pryor, and J.A. Piedrahita. 2001. Cloning to reproduce desired genotypes. *Theriogenology*, 55 : 35 – 49.
- Willadson, S.M. 1986. Transplantation in sheep embryos. *Nature (London)*, 320 : 63 – 65.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A. Kind, and K. Campbell. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 : 810 – 813.