

## TULISAN PENDEK

### Pengembangan Teknik Kariotipe Mencit (*Development Karyotypes Technique of Mice*)

Husni Mubarak<sup>1</sup>, Dyah Pewitasari<sup>2</sup>, & Ibnu Maryanto<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Sekolah Pascasarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor (IPB), Dramaga, Bogor, Indonesia; **Email:** nayo.rock@gmail.com

<sup>2</sup> Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Gedung FAPET WIL5, Institut Pertanian Bogor (IPB), Dramaga, Bogor, Indonesia. **Email:** witafor@yahoo.com

<sup>3</sup> Bidang Zoologi, LIPI, Jl. Raya Jakarta-Bogor KM. 46, Cibinong, Bogor, Indonesia.  
**Email:** ibnu\_mar@yahoo.com

**Memasukkan:** Mei 2014, **Diterima:** Agustus 2014

Mencit (*Mus musculus*) sering digunakan sebagai hewan model penelitian (Feldhamer 1999). Jumlah kromosom dari mencit 40 dan untuk mendapatkan kromosom tersebut selama ini preparasinya lebih banyak dilakukan di laboratorium daripada di lapang. Hal ini disebabkan teknik pengambilan kromosom memerlukan alat dan bahan yang tidak memungkinkan untuk kondisi lapangan. Teknik pembuatan preparat kromosom harus dilakukan secara cepat dan dalam kondisi yang steril teristimewa jika kromosom diperoleh dari darah. Oleh sebab itu, perlu dibuat adanya pengembangan teknik kariotipe yang dapat diaplikasikan di kondisi lapang.

Penelitian ini membahas tentang pengembangan teknik pembuatan kariotipe yang sesuai dengan kondisi lapang berdasarkan penelitian laboratorium yang meliputi pengujian kualitas kromosom berdasarkan perbedaan waktu injeksi inhibitor mitosis Kolkisin dan preservasi sumber maupun suspensi sel kromosom.

Kolkisin merupakan metabolit sekunder yang dapat menghambat (inhibisi) fungsi seluler seperti proses mitosis (Choi *et al.* 1999; Salai *et al.* 2001). Waktu yang dibutuhkan setelah injeksi kolkisin untuk spesimen hewan tikus dan kelelawar rata-rata berkisar antara dua sampai tiga jam (Baker *et al.* 1982; Dobigny & Xuereb 2011). Selanjutnya hasil penelitian (Pennock *et al.* 1968) yang menggunakan hewan uji dari tulang tungkai, tulang belakang (*minus spinal*

*cord*) dan gonad kadal Genus *Uta* (Family Iguanidae) yang menggunakan larutan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) ternyata juga menghasilkan kromosom yang baik. Walaupun demikian penelitian yang telah dilakukan tersebut diatas kesemuanya tidak menjelaskan berapa waktu yang terbaik untuk preservasinya.

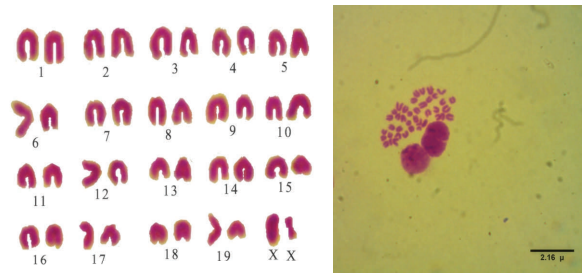
Pada analisis ini kariotipe ini dicoba perlakuan pada mencit mengikuti Baker *et al.* (1982) dan Dobigny & Xuereb (2011). Spesimen diinjeksi secara subkutan dengan 0.1 ml/ 10 g berat badan larutan ragi (3 g ragi : 2 g glukosa : 12 ml H<sub>2</sub>O) selama 12 sampai 24 jam sebelum tahap selanjutnya. Spesimen diinjeksi secara intraperitoneal dengan inhibitor mitosis Kolkisin 0.005% (0.1 ml/ 10 g berat badan) selama dua dan tiga jam sebelum didislokasi leher. Selanjutnya, larutan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) dibuat mengikuti Pennock *et al.* (1968) yaitu 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dan 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dilarutkan dengan 800 ml H<sub>2</sub>O. Larutan ditambahkan 0.01 µg/ml Vinblastine Sulfat (Velban) dan di autoklaf (20 menit, 121°C). Tulang femur mencit dipotong kedua ujungnya dan disimpan dalam larutan PBS sampai terendam seluruhnya. Preservasi dilakukan selama 2, 4, 6, 8, 12 dan 15 hari.

Sumsum tulang femur dikeluarkan dan direndam dalam larutan hipotonik KCl selama 45 menit pada suhu ruangan. Sentrifugasi dilakukan dengan

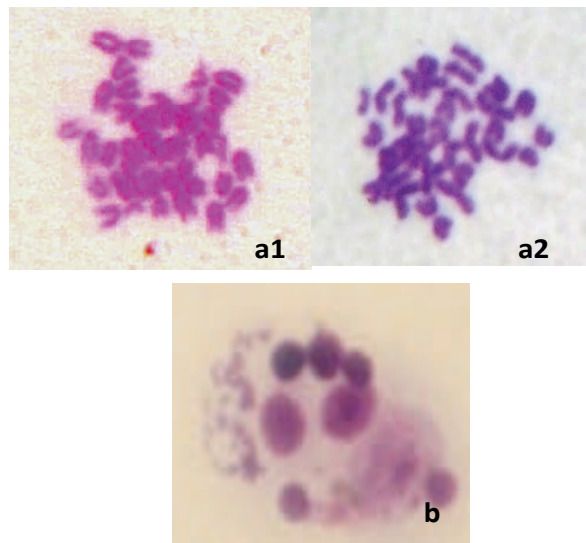
kecepatan 1200 rpm selama 10 menit. Fiksasi suspensi sel sumsum dengan larutan Carnoy (3 metanol : 1 asam asetat glasial) selama 15 menit. Suspensi sel yang telah dibuat pada tahap fiksasi sel analisis kariotipe disimpan selama 2 hari (48 jam) dan 4 hari (96 jam). Pewarnaan preparat menggunakan Giemsa 4% selama 30 menit. Preparat yang telah kering diamati di mikroskop dengan perbesaran 400 sampai 1000 kali. Kromosom yang berada pada metafase terbaik selanjutnya dipotret (Gambar1).

Kualitas kromosom dengan perbedaan inhibitasi mitosis mencit dengan kolkisin 0.005% 2 Jam dan 3 Jam mengindikasikan bahwa injeksi kolkisin 0.005% dengan waktu inhibitasi mitosis 2 jam memberikan tampilan kromosom yang lebih optimal dibandingkan waktu 3 jam (Gambar 2). Brues & Cohen (1936) menjelaskan injeksi kolkisin pada tikus lebih dari 8 jam akan menyebabkan kematian, sedangkan waktu optimal yang digunakan yaitu 2 jam. Hal ini terjadi karena kolkisin merupakan zat yang bersifat toksik terhadap organisme sehingga penggunaannya harus diperhatikan. Baker *et al.* (2003) menjelaskan rodentia, kelelawar *phyllostomid*, *shrew* dan spesies yang memiliki temperatur tubuh yang stabil membutuhkan waktu injeksi kolkisin yang paling baik antara 45 menit sampai satu jam. Sedangkan waktu 30 menit sampai 2 jam tetap diperbolehkan.

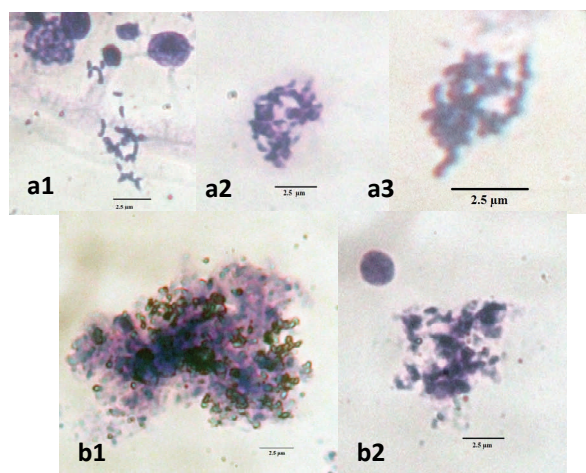
Kualitas kromosom sumsum tulang mencit pada preservasi PBS selama 2, 4, 6, 8, 12 dan 15 hari dapat diterangkan bahwa keseluruhan kromosom yang berasal dari sumsum tulang pada preservasi PBS selama 2 sampai 15 hari tidak menunjukkan hasil yang optimal. Kromosom yang didapat cenderung mengalami degradasi (Gambar 3). Perlakuan 2 hari menunjukkan hasil yang relatif lebih baik dari perlakuan 4 sampai 15 hari, sehingga batas waktu preservasi yang lebih baik yaitu 4 hari. Perlakuan 6 sampai 15 tidak menunjukkan adanya kromosom. PBS merupakan larutan garam tak beracun yang berfungsi menyeimbangkan konsentrasi garam di



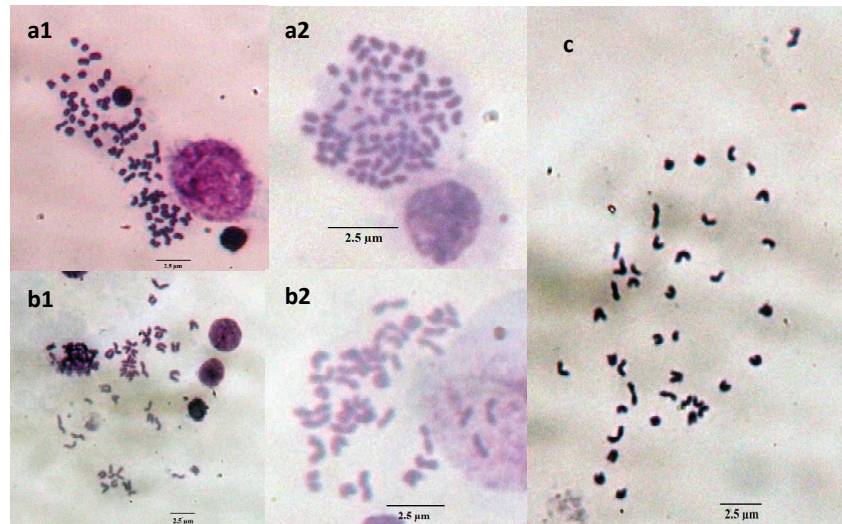
**Gambar 1.** Kariotipe *M.musculus* betina dengan analisis kariotipe *fresh*; Perbesaran 1000 kali; Skala bar 2.16 μm



**Gambar 2.** Kromosom perbedaan inhibitasi mitosis kolkisin 0.005% a) kromosom mencit perlakuan 2 jam (a1,a2), b) kromosom mencit perlakuan 3 jam; perbesaran 400 kali



**Gambar 3.** Kromosom perlakuan preservasi PBS a) kromosom mencit perlakuan 2 hari (a1,a2,a3), b) kromosom mencit perlakuan 4 hari (b1, b2); perbesaran 400 kali; skala bar 2,5 μm



**Gambar 4.** Kromosom perlakuan preservasi Carnoy a) kromosom mencit perlakuan langsung (*fresh*) (a1,a2), b) kromosom mencit perlakuan 2 hari (48 jam) (b1, b2), kromosom mencit perlakuan 4 hari (96 jam) (c); perbesaran 400 kali; skala bar 2,5 µm

sekitar sel, sehingga mencegah terjadinya osmosis dan pecahnya sel (Martin *et. al* 2001; Martin *et. al* 2002). Berdasarkan hasil, jika dibandingkan dengan penelitian Pennock *et al.* (1968), preservasi PBS cenderung lebih cocok digunakan pada reptil dibandingkan mamalia.

Kualitas kromosom suspensi sel sumsum tulang mencit pada preservasi *Carnoy* 2 hari (48 jam) dan 4 hari (96 jam) akan menunjukkan hasil yang baik jika preservasi dilakukan sampai pada preservasi hari ke 4 (96 Jam). Pada preservasi Carnoy 2 hari (48 jam), kromosom menyebar namun beberapa ada yang saling tumpang tindih. Lengan tampak jelas, sentromer jelas sedangkan pita (*band*) belum terlihat jelas. Jumlah kromosom relatif belum bisa teridentifikasi. Hasil preservasi Carnoy 4 hari (96 jam) menunjukkan kromosom menyebar beraturan (dalam satu sel) dengan sangat baik. Bentuk kromosom jelas, tetapi dengan ukuran yang relatif lebih kecil. Lengan dan sentromer tampak jelas tetapi pita (*band*) masih tidak terlihat (Gambar 4).

Larutan Carnoy merupakan fiksasi inti (nukleus) dengan komponen yang berupa metanol dan asam asetat; metanol dan asam asetat dapat berinteraksi dengan melakukan pembentukan ikatan hidrogen dalam jaringan. Senyawa asosiasi tersebut menstabilkan

struktur jaringan dan mencegah atau meminimalkan penyusutan (Puchler *et al.* 1968). Penggunaan preservasi suspensi sel sumsum tulang dengan larutan fiksatif Carnoy dapat digunakan hingga 96 jam (ditandai dengan hasil yang optimal). Hal tersebut memungkinkan suspensi yang telah dibuat di lapang dapat dianalisis kembali di kondisi laboratorium. Jangka waktu tersebut merupakan jangka waktu maksimal yang peneliti sarankan.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Baker, RJ., MW. Haiduk, LW. Robbins, A. Cadena, BF. Koop. 1982. Chromosomal studies of South American bats and their systematic implications. *Special Publication Pymatuning Laboratory of Ecology*. 6: 303–327.
- Baker, RJ., M. Hamilton, & DA. Parish. 2003. Preparations of mammalian karyotypes underfield conditions. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech University*. 228: i+1-8.
- Brues, AM., & A. Cohen. 1936. PMCID: Effects of colchicine and related substances on cell division. *Biochemistry Journal*. 30: 1363-1368.

- Choi, SS., KF. Chan, Ng. HK, WP. Mak. 1999. Colchicine-induced myopathy and neuropathy. *Hong Kong Medical Journal*. 5:204-207.
- Dobigny & A. Xuereb. 2011. Cytogenetics: karyotyping and tissue sampling for fibroblast cell culture. Dalam: Herbreteau V, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Chaval Y, Cosson JF, Morand S (eds.) *Protocols for Field and Laboratory Rodent Studies*. Kasetsart University Press, Bangkok, pp. 29-30.
- Feldhamer, GA., LC. Drickamer, SH. Vessey, JF. Merritt, CW. Krajewski. 2007. *Mammalogy: Adaptation, Diversity, Ecology*. Johns Hopkins University Press. Baltimore.
- Levan, A. 1938. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*. 24: 471-486.
- Martin, NC., AH. McGregor, N. Sansom, S. Gould, DJ. Harrison. 2001. Phenobarbitone-induced ploidy changes in liver occur independently of p53. *Toxicology Letters*. 119: 109-115.
- Martin, NC., CT. McCullough, PG. Bush, L. Sharp, AC. Hall, DJ. Harrison. 2002. Functional analysis of mouse hepatocytes differing in DNA content: Volume, receptor expression, and effect of IFN $\gamma$ . *Journal of Cellular Physiology*. 191: 138-144.
- Pennock, LA., DW. Tinkle, MW. Shaw. 1968. Chromosome number in the lizard genus *Uta* (family Iguanidae). *Chromosoma*. 24:467-476.
- Puchtler, H., FS. Waldrop, HM. Conner, MS. Terry. 1968. Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *Histochemie*. 16:361-371.
- Salai, M., E. Segal, I. Cohen, I. Dudkiewicz, N. Farzame, S. Pitaru, N. Savion. 2001. The inhibitory effects of colchicine on cell proliferation and mineralisation in culture. *J. Bone Joint Surgery [Br]*. 83-B: 912-15.