

# LAPORAN AKHIR

Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi (M)



## UJI AKTIFITAS DAN ANALISIS KALSIMUM INTRASELULLER ( $Ca^{++}$ ): FUNGSI PROTEIN TOTAL DAN PROTEIN SPESIFIK 100 kD DARI EKSTRAK SPERMATOCYTES KAMBING DALAM AKTIVASI OOSIT

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

### Ketua/Anggota Tim

<b>Prof. Dr.Ir. Moch. Nur Ihsan, MS.</b>	<b>NIDN</b>	<b>0012065308</b>
<b>DR. Dra. Sri Rahayu, MKes.</b>	<b>NIDN</b>	<b>0028056206</b>
<b>DR.Ir. Gatot Ciptadi, DESS.</b>	<b>NIDN</b>	<b>0012056010</b>
<b>DR.Ir. Sri Wahjuningsih, MSi.</b>	<b>NIDN</b>	<b>0010016408</b>

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya Nomor : DIPA-023.04.2.414989/2013, Tanggal 5 Desember 2012, dan berdasarkan SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor : 295/SK/2013 tanggal 12 Juni 2013

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**Desember, 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Kegiatan** : UJI AKTIFITAS DAN ANALISIS KALSIMUM INTRASELULLER (Ca<sup>++</sup>): FUNGSI PROTEIN TOTAL DAN PROTEIN SPESIFIK 100 kD DARI EKSTRAK SPERMATOZOA KAMBING DALAM AKTIVASI SEL OOSIT

**Peneliti / Pelaksana**  
Nama Lengkap : Prof.Dr.Ir. MUHAMMAD NUR IHSAN MS.  
NIDN : 0012065308  
Jabatan Fungsional :  
Program Studi : Ilmu Ternak  
Nomor HP :  
Surel (e-mail) : m\_nur\_ihsan@yahoo.com

**Anggota Peneliti (1)**  
Nama Lengkap : Dr.Ir. GATOT CIPTADI DESS.  
NIDN : 0012056010  
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**Anggota Peneliti (2)**  
Nama Lengkap : SRI WAHJUNINGSIH  
NIDN : 0010016408  
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**Anggota Peneliti (3)**  
Nama Lengkap : SRI RAHAYU  
NIDN : 0028056206  
Perguruan Tinggi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra :  
Alamat :  
Penanggung Jawab :  
**Tahun Pelaksanaan** : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
**Biaya Tahun Berjalan** : Rp. 90.000.000,00  
**Biaya Keseluruhan** : Rp. 170.000.000,00

Malang, 30- 11- 2013

Mengetahui  
Dekan Fapet LIB  
  
(Prof. Dr. Ir. Kusnarto)  
NIP/NIK 198004061985031005

  
(Prof. Dr. Ir. Siti Chusnaeni MS)  
NIP/NIK 195305141980012001

Ketua Peneliti,

  
(Prof. Dr. Ir. MUHAMMAD NUR IHSAN MS.)  
NIP/NIK.195306121981031002

## UJI AKTIFITAS DAN ANALISIS KALSIUM INTRASELULLER (Ca<sup>++</sup>): FUNGSI PROTEIN TOTAL DAN PROTEIN SPESIFIK 100 kD DARI EKSTRAK SPERMATOZOA KAMBING DALAM AKTIVASI OOSIT

<sup>1</sup>Muhammad Nur Ihsan, <sup>2</sup>Sri Rahayu, <sup>1</sup>Gatot Ciptadi dan <sup>1</sup>Sri Wahjuningsih

<sup>1</sup>Fakultas peternakan UB, <sup>2</sup> Fakultas MIPA-Biologi UB

### RINGKASAN

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan uji aktifitas protein total dan protein spesifik ekstrak spermatozoa dengan berat molekul 100 kD dalam peran dan fungsinya untuk melakukan aktivasi dari oosit kambing *M-II arest* hasil IVM untuk oosit partenogenesis setelah dilakukan mikroinjeksi dalam sitoplasma oosit. Ekstrak Spermatozoa Kambing (ESKB) diisolasi dari ejakulat semen kambing dari bangsa yang sama dengan oosit. Fokus penelitian adalah mempelajari proses dan kejadian-kejadian selama aktivasi oosit (partenogenesis) setelah diinjeksi/transfensi dengan protein total dan spesifik ekstrak spermatozoa 100 kD. Produk ESKB ini nantinya diharapkan dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan kulkur sel gamet dan produksi embrio.

Metode yang digunakan adalah eksperimental laboratorium. Oosit kambing mature metafase II diperoleh dengan melakukan *in vitro maturation* (IVM) oosit yang diisolasi dari kambing pra-pubertas (K0) dan kambing dewasa (K1). IVM dilakukan dalam medium dasar *TCM199* + 10 % FBS + 10 ul FSH + 25 ul LH + gentamycin dalam inkubator CO<sub>2</sub> 5 % selama 24 jam, dan diseleksi *M-II mature* oosit berdasarkan ekstruksi polar bodi I. sampai digunakan untuk perlakuan aktivasi. Perlakuan aktivasi adalah Etanol 7 % , 7 menit. Etanol 7 % , 7 menit + 2 mM 6-DMAP, 4 jam Percobaan mikroinjeksi ESKB dilakukan pada aktivasi oosit partenogenesis *M-II* dan oosit rekonstruksi. dan Ca ionophore A-23187,10  $\mu$ M , 7 menit + 2 mM 6-DMAP, 4 jam Injeksi ESKB dilakukan langsung dalam sitoplasma oosit. Masing masing perlakuan diulang 10 kali dengan jumlah sel oosit 10/100 ul medium drop. Sebagai kontrol adalah induksi aktivasi menggunakan bahan kimia kombinasi Ca-ionophore A-23187 dan 6-DMAP. Variabel yang diamati adalah persentase oosit yang teraktivasi berdasarkan pada *corticol granule exocytosis* *Pronuclear formation*, dan *Cleavage rate* untuk partenogenesis.

Hasil menunjukkan bahwa CSE kambing memiliki 11 pita protein dan sistim kultur sel telah bekerja normal sesuai dengan standart yang berikutnya bisa dilakukan perlakuan dengan suplementasi secara kimia maupun menggunakan protein ESKB maupun protein 100 kD. Profil pita protein SE kambing memiliki protein 100,16 kDa, dimana protein dengan berat molekul berkisar 100 kDa pada sperma mengandung materi yang efektif dalam mengaktivasi oosit. Adanya persamaan profil pita protein 100 kDa pada kambing dan spesies lain (babi) diduga protein tersebut juga memiliki kemampuan yang sama. Disimpulkan, Pita protein dengan berat molekul 100 kDa ditemukan pada ES. Efek aktivasi ES dengan konsentrasi 2,5  $\mu$ g/ml selama 2 jam menunjukkan jumlah pembelahan pada oosit *M-II* kambing 36,33%, dan pada paparan protein 100 kDa ES menunjukkan jumlah pembelahan yang lebih rendah 2%, namun hal ini masih diperlukan penelitian keberadaan enzim atau peran zat aktif pada ekstrak spermatozoa.

**Kata Kunci** : Aktivasi Sel, Ekstrak Spermatozoa, protein 100 kD, *M-II* Oosit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Alberio,R., V. Zakharchenko, J. Motlik and E. Wolf. 2001. Mammalian oocyte activation: lesson from the sperm and implication for nuclear transfer. *Int.J. Dev.Biol.* **45**: 797 – 809.
- Alberio,R., S. Brero, J. Motlik, E. Wolf and V. Zakharchenko,. 2001. Remodeling of donor nuclei, DNA synthesis, and ploidy of bovine cumulus cell nuclear transfer embryos: effect of activation protocol. *Mol.Reprod.Dev.* **59**: 371 – 379.
- Ari Wahyuni, E. G. Ciptadi, Aulai Am dan B. Siswanto. 2008. Isolasi dan karakterisasi protein crude sperm extract kambing dan sapi. Makalah. tidak di publikasikan . Pasca Sarjana ,Universitas Brawijaya . 2008.
- Choi, Y.H., C.C Love,. Y.G Chung., D.D Varner., M.E Westhusin., R.C Burghardt, and K. Hinrichs. 2002. Production of nuclear transfer horse embryos by piezo-driven injection of somatic cell nuclei and activation with stallion sperm cytosolic extract. *Biologi of Reproduction* **67**: 561 – 567.
- Choi, Y.H., T. Shin. C.C Love., D.D Varner., R.C Burghardt., and K. Hinrichs., 2001. Effect of initial cumulus morphology and addition of cytochalasin B on fusion, activation and cleavage of horse oocytes undergoing nuclear transfer. *Theriogenology*. Abstract. *Proc. The Animal Conference International Embryo Transfer Soc.* Nebraska USA:13 – 16 .
- Ciptadi, G. 2005. Pengembangan metode aktivasi oosit rekonstruksi hasil transfer nukleus intra sitoplasma (TNIS) untuk produksi embrio kloning. DESERTASI. Pasca Sarjana Unibraw.
- Ciptadi, G. 2004. Pengembangan metode Aktivasi Oosit Rekonstruksi hasil transfer nukleus intrasitoplasma. Tidak dipublikasikan.
- Fissore R.A., and J.M.Robl. 1994. Mechaniss of calcium oscilations in fertilized rabbit eggs. *J. Dev. Biol* **166**: 634 – 642.
- Fissore,R.A., C. Pinto Correia, J.M. Robl. 1995. Inositol triphosphate-induced calcium release in the generation of calcium oscilation in bovine eggs. *J. Biol . Reprod* **53**: 766 – 744.
- Fulka Jr.J., I. Karnikova., R.M Moor. 1998. Oocyte polarity: ICSI, cloning and related techniques. *Human Reprod* **13**: 3303 – 3305.
- Gasparriani .B, L., A. Boccia De Rosa, R. Di Pallo , G. Campanile , L. Zicarelli. 2004. Chemical activation of buffalo (*Bubalis bubalis*) oocyte by different methods: effect of aging parthenogenetic development. *Theriogenology* **62** : 1627 – 1637.
- Grupen, C.G., M.B. Nottle and H. Nagashima. 2002. Calcium release at fertilization: artificially mimicking the oocyte's response to sperm. *J. Reprod.Dev.* **48**: 313 – 333.
- Ideta,A., M. Urakawa, Y. Aoyagi and K. Saeki. 2005. Early morphological nuclear events and developmental capacity of embryos reconstructed with fetal fibroblasts at the M or G1 phase after intracytoplasmic nuclear in cattle. *J. Reprod and Development* **51** (2) : 187 – 194.
- Ikumi, S., M. Asada, K. Sawai., and Y. Fukui. 2003. Effect of activation methods for bovine oocytes after intracytoplasmic injection. *J. Reprod. Dev* **49**: 37 – 43.

- Liu L, J.Ju, X. Yang. 1998. parthenogenetic development and protein pattern of newly matured bovine oocyte after chemical activation. *Molecular reprod. Dev.* **49**: 298-307.
- Liu L, J.Ju, X. Yang. 1998. Differential inactivation of MPF and MAPK following parthenogenetic activation of bovine oocyte. *Biol. Reprod* **59**: 537 – 545.
- Loi, P., S. Boyazoglu, J. Fulka, Jr., S. Naitana, P. Capai. 1999. Embryo cloning by nuclear transfer: experiences in sheep. *J. Livestock Production Sciences* **60** : 281-294.
- Machaty, Z., A.J. Bonk, B. Kuhholzer, and R.S. Prather. 2000. Porcine Oocyte Activation Induced by a Cytosolic Sperm Factor. *J. Molecular Reproduction Development* **57**:290-295
- Matsuura, D and T. Maeda. 2006. Effect of Sperm Extract and its Molecular Weight Fractions on Oocyte Activation in Miniature Pig Spermatozoa. *J. Mamm. Ova Res.* **23**:122-127.
- Miyazaki, S and M. Ito. 2006. Calcium Signals for Egg Activation in Mammals. *Journal Pharmacological Sciences* **100**: 545-552.
- Mitalipova M, T. Dominko, B. Haley, Z. Beyhan, E. Memili, N. First. 1998. Bovine oocytes cytoplasm reprograms somatic cell nuclei from various mammalian species. *Theriogenology* **49**(1): 389 abstract.
- Nakada K. and J. Mizuno. 1998. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology* **50**: 269- 282.
- Okada, K, T. Miyano and M. Miyake. 2004. Activation and Development of Pig Oocytes after microinjection of Crude Sperm Extract.. *J. Mammalian Ova Research* Vol 21, 134 – 140.
- Ongeri, E.M., C.L. Bormann, R.E. Butler, D. Melican, W.G. Gavin, Y. Echelard, R.L. Krisher and E. Betboodi. 2001. Development of goat embryos after in vitro fertilization and parthenogenetic activation by different method. *Theriogenology* **55** (9): 1933 – 1945.
- Petr, J., D. Urbankova, M. Tomanek, J. Rozinek, F. Jilek. 2002. Activation of in vitro pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodamine receptors. *Animal Reproduction Science* **70**: 235 – 249.
- Prather, R.S., B. Kuhholzer, L. Lai, and K.W. Park. 2000. Changes in the structure of nuclei after transfer to oocytes. *Cloning* **2** (3), Mary Ann Liebert, Inc.
- Prather, R.S., M. Sims and N.L. First. 1990. Nuclear transplantation in the pig embryos: nuclear swelling. *J. Exp. Zool.* **225**: 355 – 358.
- Renard, J.P., Q. Zhou, D. LeBourhis, P. Chavate-Palmer, L. Hue, Y. Heyman and X. Vignon. 2002. Nuclear transfer technologies: between successes and doubts. *Theriogenology* **57** (1): 203 – 222.
- Tanaka, H. 2001. Reproductive biology and biotechnology. JICA, Japan International Cooperation Agency, Indonesia .
- Wang, W.H., Z. Machaty, N. Ruddock, L.R. Abeydeera, A.C. Boquest, R.S. Prather, B.N. Day. 1999. Activation of porcine oocytes with calcium ionophore: Effects of extracellular calcium. *Mol. Reprod Dev.* **53**: 99 – 107.