

Kode/Rumpun Ilmu: 216/Produksi Ternak

LAPORAN AKHIR PENELITIAN HIBAH KOMPETENSI



Pengembangan Kultur *In Vitro* (IVM, IVF, IVG dan IVP) Sel Gamet Ternak Lokal Menggunakan Ekstrak Spermatozoa Sebagai Aktivator Biologis dan Kandidat Potensial Terapi Reproduksi

Tahun ke 2 dari Rencana 2 tahun

Dr. Gatot Ciptadi, Ir., DESS. NIDN. 0012056010

Dr.Dra. Sri Rahayu, MKes. NIDN.0028056206

Dr.dr. Budi Siswanto, SpOG. NIP. 19551008 198303 1 012

Prof.Dr.Ir. Moch. Nur Ihsan, MS. NIDN. 0012065308

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penugasan Penelitian Strategis Nasional Nomor : 129/SP2H/PL/Dit.Litabmas/III/2012 tanggal 7 Maret 2012

**Universitas Brawijaya
November, 2013**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Kegiatan	: Pengembangan Kultur In Vitro (TVM, IVF, IVG dan IVP) Sel Gamet Ternak Lokal Menggunakan Ekstrak Spermatozoa Sebagai Aktivator Biologis dan Kandidat Potensial Terapi Reproduksi
Peneliti / Pelaksana	
Nama Lengkap	: Dr.Ir. GATOT CIPTADI DESS.
NIDN	: 0012056010
Jabatan Fungsional	:
Program Studi	: Peternakan
Nomor HP	: 0817 380 560
Surel (e-mail)	: ciptadi6@gmail.com
Anggota Peneliti (1)	
Nama Lengkap	: Prof.Dr.Ir. MUHAMMAD NUR IHSAN MS.
NIDN	: 0012065308
Perguruan Tinggi	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Anggota Peneliti (2)	
Nama Lengkap	: SRI RAHAYU
NIDN	: 0028056206
Perguruan Tinggi	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Institusi Mitra (jika ada)	
Nama Institusi Mitra	:
Alamat	:
Penanggung Jawab	:
Tahun Pelaksanaan	: Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan	: Rp. 126.000.000,00
Biaya Keseluruhan	: Rp. 221.000.000,00



Malang, 30-11-2013

Ketua Peneliti,

(Dr. Ir. GATOT CIPTADI DESS.)
NIP/NIK 196005121987011001

RINGKASAN

Pengembangan Kultur *In Vitro* (IVM, IVF, IVG dan IVP) Sel Gamet Ternak Lokal Menggunakan Ekstrak Spermatozoa Sebagai Aktivator Biologis dan Kandidat Potensial Terapi Reproduksi

Gatot Ciptadi, Sri Rahayu, Nur Ihsan dan B. Siswanto
Universitas Brawijaya, Malang

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan kultur *in vitro* sel gamet spermatozoa dan oosit untuk produksi embrio dengan memanfaatkan semaksimal mungkin sumber-sumber material genetik ternak lokal dalam kultur yang lebih baik dan optimal, yaitu *in vitro* maturasi (IVM), *in vitro* Fertilisasi (IVF), *in vitro growth* (IVG) oosit, dan *in vitro* production (IVP) embrio. Sistem kultur yang dikembangkan adalah penggunaan suplementasi Ekstrak Spermatozoa (ES) sebagai aktivator alami sel telur. Tim peneliti UB telah melakukan serangkaian penelitian sejak tahun 2005. Hasil utama dari penelitian yang telah dilakukan adalah diantaranya beberapa paper yang telah dipresentasikan di seminar internasional yaitu: 13 th AAAP Hanoi, Vietnam, 2008, dan 14 th AAAP, Pingtung Taiwan 2010 serta the ASPIRE, Bangkok, Thailand 2010. Hasil penelitian tentang penggunaan Ekstrak Spermatozoa dalam kultur *in vitro* ini telah didaftarkan paten dengan No. P00201000765, tertanggal 24 Nopember 2010. Namun demikian, masih diperlukan pembuktian secara *in vivo* menggunakan hewan percobaan tentang potensi ES sebagai kandidat potensial untuk terapi reproduksi, khususnya mengatasi masalah subfertilitas dan infertilitas ternak lokal.

Pada penelitian lanjutan ini dilakukan eksperimen laboratorium *in vitro* lebih mendalam dan uji coba *in vivo* dengan hewan percobaan (kelinci lokal/*Orytolagus cuniculus* dan kambing/domba lokal) untuk memperoleh data jumlah anak per kelahiran (*litter size*), sebagai data pendukung untuk keperluan publikasi di jurnal internasional dengan mengembangkan makalah yang telah dipresentasikan dalam forum seminar internasional. Secara khusus penelitian akan difokuskan pada pemahaman proses aktivasi sel oosit M-II dengan suplementasi ES. Aktivasi dilakukan dengan suplementasi ES pada oosit M-II, oosit terfertilisasi (hasil IVM dan IVF) dan pada medium IVP dengan ES secara interspesies dan akan dilakukan analisis profil intensitas Calcium *intra selluler* (Ca^{++} *dynamic intensity*) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscop (CLSM)-Flou-3 staining*, sehingga akan memperdalam pemahaman tentang proses aktivasi dan fertilisasi (*cleavage*) sel yang akan bermanfaat sebagai bukti potensi ES sebagai kandidat terapi reproduksi (infertilitas). Selain itu hasil penelitian juga dimaksudkan untuk memecahkan permasalahan hasil aktivasi oosit rekonstruksi (hasil tranfer inti) yang masih sangat rendah keberhasilannya dari hasil penelitian tim sebelumnya dalam memproduksi sel embrio kloning ternak menggunakan sel somatik (fibroblas dan epitel) sebagai donor. Data-data yang diperoleh juga sangat penting untuk lebih memperkuat bukti tentang potensi ES sebagai aktiavtor alami untuk terapi infertilitas, dimana draft paten telah didaftarkan tahun 2010 dan masih menunggu tahapan dilakukan verifikasi substansi. Hasil penelitian juga akan menjadi bahan penunjang dari buku (hibah penulisan buku teks) tentang bioteknologi sel gamet dan produksi embrio kloning, yang masih dalam tahapan editing oleh UB Press untuk tahun 2011- 2012, disamping direncanakan akan dihasilkan buku ajar tentang sistem kultur sel *in vitro* yang berbasis pada kondisi lokal (Indonesia) yang ada. Karya invensi

yang diusulkan untuk mendapat HAKI yang kedua adalah Produk ES (zat aktif-biologis) sebagai ekstrak/zat aktif untuk mengatasi masalah reproduksi (infertilitas/subfertilitas) ternak lokal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi ES secara umum terbukti dapat meningkatkan tingkat maturasi (IVM-MII Oosit), khususnya sebagai suplemen aktivasi secara parthenogenetik (6.00% vs 36.33%). Namun demikian, data sementara menunjukkan bahwa protein spesifik 100 KD relatif lebih rendah tingkat kemampuannya jika dibandingkan dengan Crude Sperm Ekstrakt. Bagian dari penelitian yang mendalami tentang karakter M-II oosit yang diaktivasi menunjukkan pola yang berbeda jelas antara oosit kontrol dan yang teraktivasi dengan Ekstrak spermatozoa. Uji laboratorium terhadap tingkat Maturasi Oosit dari preantral folikel (IVG) menunjukkan bahwa sumberoosit alternatif ini cukup potensial sebagai sumber oosit M-II, karena menunjukkan hasil kompetensi yang cukup. Hanya yang menjadi masalah dalam pengembangan metoda IVG adalah isolasi preantral folikel yang sering mengalami lisis dan tingkat kontaminasi yang masig relatif tinggi selama kuktur yang panjang. Hasil penelitian telah dipresentasikan I Internasional Seminar WASET (world Academy of Science, Engineering and Technology, Paris Juni 27-28, 2012. Penulis juga diminta sebagai pembicara utama The 2 nd International Conference of Life Sciences, UB 2012, dengan Judul The phenotype character of Ca Intensity of M-II oocyte activated by chemical agen and Crude sperm extract. Buku berjudul Bioteknologi sel gamet dan Kloning hewan tahun 2012 (juli 2012) telah diterbitkan UB Press. Satu lagi Buku tentang Kultru Sel Gamet: Mekanisme maturasi dan aktivasi telah terbit oleh Selaras Press, namun masih perlu perbaikan kembali sebelum diperbanyak secara massal untuk diedarkan secara nasional. Pada tahun 2013 makalah juga disajikan dalam forum internasional WCAP-Beijing China, sementara pada tahun yang sama juga diundang sebagai Guest Lecture di RMUTL Chiangmay-Thailand.

Tingkat Maturasi Oosit dari preantral folikel (IVG) menunjukkan bahwa sumber oosit alternatif ini cukup potensial sebagai sumber oosit M-II, karena menunjukkan hasil kompetensi yang cukup. Penggunaan CSE dan ES 100 KD membantu meningkatkan keberhasilan IVM dan IVF. Hanya yang menjadi masalah dalam pengembangan metoda IVG adalah isolasi preantral folikel yang sering mengalami lisis dan tingkat kontaminasi yang masig relatif tinggi selama waktu kuktur yang panjang

Hasil penelitin juga akan menjadi bahan penunjang dari buku (hibah penulisan buku teks) tentang bioteknologi sel gamet dan produksi embrio kloning dan buku buku lain yang relevan, yang masih dalam tahapan editing oleh UB Press untuk tahun 2012, disamping direncanakan akan dihasilkan buku ajar tentang sistem kultur sel *in vitro* yang berbasis pada kondisi lokal (Indonesia) yang ada. Karya invensi yang diusulkan untuk mendapat HAKI yang kedua adalah Produk ES (zat aktif-biologis) sebagai ekstrak/zat aktif untuk mengatasi masalah reproduksi (infertilitas/subfertilitas) ternak lokal.

Kata Kunci : Sel Kultur, Gamet, Sperm Extract, Aktivasi, Reproduksi

Improvement of In Vitro Cells Culture (IVM, IVF, IVG dan IVP) of Gamet Cell of Domesticated Animals Using Sperm Extract as an Potential Activator Agent in Local Assisted Reproduction.

Gatot Ciptadi, Sri Rahayu and B. Siswanto
Brawijaya University, Malang, Indonesia.

SUMMARY

The research aims are improving culture cells system in vitro of gamet of local animals to produce embryo with several oocyte resources available, i.e In vitro Maturation (IVM), In vitro fertilization (IVF), in vitro growth (IVG and in vitro Production of embryos. The culture cells system performed in this research were standard culture which supplemented with different levels of concentration of Sperm Extract (SE). SE was assumed as natural activator agent like chemical activator. Target of this research are a number of papers and articles that will be presented in international conference/proceeding and international journal. Data of preliminary research were presented in a number of international conferences, i.e: the 13th AAAP Hanoi, Vietnam 2008, 14th AAAP Pingtung Taiwan and ASPIRE conference Bangkok 2010. Patent was registered (P00201000765) 24 November 2010.

Research was focused in understanding how activation process of oocytes Metaphase-II (M-II) and cell fertilization (IVF). Confirmation of oocyte activation was performed through the dynamic of Ca^{++} intracellularly using confocal laser scanning microscope (CLSM-Fluo 3 staining). Research was also aimed to understand and to solve the problem of lower activation rates of reconstructed cell (enucleated oocyte was injected by somatic donor cell of fibroblast or epithel). Result of this research will be very useful to complete a reasonable data for SE potential as natural activator in problems related to reproduction and infertility.

The 1st year result of result showed that supplementation of SE in general was affected to improve maturation rate (IVM), especially in relation to parthenogenetic activation (6.00 % vs 36.33 %). Meanwhile, utilization of Protein 100 kD isolated from SE still resulted in lower maturation rate. So, Crude Sperm extract was better than protein 100 kD. The explanation of this research is still in progress. Calcium Intensity profile is completely different significantly between cell were activated and non-activated. Oocyte isolated from preantral follicle then cultured (IVG) was considered as new potential on M-II oocyte for embryo production in vitro. In the case of IVG, the main problem was cell lysis during isolation process and higher contamination rate during long period of culture of follicles. An international presentation was done in International Seminar of WASET (World Academic of Science, Engineering and Technology, Paris June 27-28, 2012) and the 2nd International Conference of Life Sciences, UB 2012, with the title of The phenotype character of Ca Intensity of M-II oocyte activated by chemical agent and crude sperm extract.

Key Words: Cell culture, Gamet, Sperm Extract, Activation, Reproduction

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.
- 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, Sutiman B sumitro, A. Boediono, T. Susilawati and B. Siswanto. 2006. The potential production of reconstructed embryo of local goat through intra cytoplasmic direct nuclear injection using somatic cell. Proc. seminar Internasional “International Seminar on Tropical Animal Production” Yogyakarta, 6-9 Nopember 2006”.
- Ciptadi, G. 2004. Pengembangan metode Aktivasi Oosit Rekonstruksi hasil transfer nukleus intrasitoplasma. Proc Seminar internasional .
- Cohen, A.T., E. Eliyahu and R. Shalgi. 2002. Signalling in mammalian egg activation: role of protein kinases. *Molecular and Cellular Endocrinology* **187**: 145 – 149.
- Eliyahu, E., A., Talmor-Cohen, R Shalgi, 2002. Signaling through protein kinases during egg activation. *Reproductive Immunology* **53** : 161 – 169.
- 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.
- Gruppen, 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.
- Kishi, M., Y. Itagaki, R. Takakura, M Imamura, T Sudo, M Yoshinari, M Tanimoto, M Yasue, N Kashima. 2000. Nuclear transfer in cattle using colostrum-derived mammary gland epithelial cells and derived fibroblast cells. *Theriogenology* **54** (5): 675 – 684.
- Li X, L.H.A Morris, W.R. Allen. 2000. Chromatin reprogramming in enucleated horse oocytes injected with cumulus cell nuclei. *J. Reprod fertil. Abstract*; **25**: 77 (Abstract 211).

- Liu J.L., M. K. Wang, Q.Y shun, Z. Xu and D.Y Chen. 2000. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. *J. Theriogenology* **54** : 984 – 998.
- Loi,P, S.Boyazoglu , J.Fulka .Jr. , S Naitana, P. Capai. 1999. Embryo cloning bu nuclear transfer: experiences in sheep. *J. Livestock Production Sciences* **60** : 281-294.
- Loi,P. S. Ledda, Jr.J. Fulka, P. Cappai, R.M. Moor. 1998. Development of Parthenogenetic and Cloned Ovine Embryos: Effect of activation protocols. *Biol Reprod.* **58**: 1177 – 1187.
- Ogura,A., K. Inoue, N. Ugonuki, O. Suzuki, J.Lee, J. Ishino, J. Matsuda. 2000. production of male cloned mice from fresh, cultured, and cryopreserved immature sertoli cells. *Biol. Reprod.* **62**: 1579 – 1584.
- 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, EM., 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.
- 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.
- Sedmikova, M., J. Burdova, J. Petr, M. Etrych, J. Rozinek, F. Jilek. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A 23187. *Theriogenology* **60**: 1609 – 1620.
- Siswwanto, B., G. Ciptadi, Aulani Am dan S Rahayu. 2008. The supplementation influence of Crude sperm extract on chemical activation medium to capacity of parthenogenetic induction on matured oocyte in vitro. Proc Seminar internasional PFK-UNAIR-UPM Malaysia.
- Tada,T., H. Kimura and M. Tada. 2004. Nuclear reprogramming and epigenetic reprogramming. *J. Mam. Ova Res.* **21**: 97 – 104.
- Tanaka, H. 2001. Reproductive biology and biotechnology. JICA, Japan International Cooperation Agency, Indonesia .
- Yi, Y.J and C.S. Park. 2005. Parthenogenetic development of porcine oocytes treated by ethanol, CHX, Cytochalasin B and 6-DMAP. *Anim. Repro. Sci.* **86**: 297 – 304.