

KOMPETENSI AKTIVASI PROTEIN EKSTRAK SPERMATOZOA PADA OOSIT M-II KAMBING BERDASARKAN ANALISIS PROFIL INTENSITAS KALSIUM (Ca^{+2})

The Activation Competent of Sperm Extract on M-II Goat Oocyte Base On the Calcium Intensity Profile Analysis (Ca^{+2})

Gatot Ciptadi¹, Sri Rahayu², Budi Siswanto³, Eva Ari Wahyuni⁴, Aulanni'am⁵, dan Nur Ihsan¹

¹ Bagian Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Brawijaya, Malang

² Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

³ Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya-Rumah Sakit Umum Syaiful Anwar, Malang

⁴ Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo, Madura

⁵ Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya, Malang

E-mail: ciptadi@ub.ac.id

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengkarakterisasi profil ekstrak spermatozoa (ES) dengan *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) elektroforesis dan mempelajari potensi ES dalam aktivasi M-II oosit. Kedua isolat protein total ES (2,5 µg/ml) serta protein spesifik 100 kD (1,98 µg/ml) disuplementasikan dalam medium aktivasi *tissue culture medium* (TCM)-199 stok. Intensitas Ca^{+2} diamati dengan fluo-3 menggunakan *confocal laser scanning microscope* (CLSM). Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi ES dan 100 kD protein menghasilkan oosit teraktivasi (*cleavage*) masing-masing 43,75 dan 2,00%. Intensitas Ca^{+2} menunjukkan adanya variasi dan pola yang berbeda, yakni intensitas fluoresen lebih tinggi pada oosit teraktivasi.

Kata kunci: ekstrak spermatozoa, oosit, aktivasi, protein 100 kD

ABSTRACT

Sperm factors have been used to activate M-II oocytes artificially. Chemicals activator showed their capacities in parthenogenetic activation of M-II oocyte, but still resulted in improper, lower and partially achievement. Research aimed to characterized goat Sperm Extract (SE) protein profile to study the SE and 100 kD protein potential for improving activation rate of M-II oocytes which it was characterized by SDS-PAGE electrophoresis. Both isolate total protein of SE (2.5 ug/ml) and spesific 100 kD protein (1.98 µg/ml) were supplemented to medium of TCM 199 stock. The Ca^{+2} intensity was observed by fluo-3 with Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Result showed that supplementation of SE and 100 kD protein resulted in approximately 43.00 % and 2.00 % of M-II oocyte cleavage. Image of Ca^{+2} intensity demonstrate the variations among activated M-II goat oocytes which higher intensity of calsium on activated oocytes.

Key words: sperm extract, oocyte, activation, protein 100 kD

PENDAHULUAN

Pada fertilisasi oosit oleh spermatozoa terjadi kenaikan konsentrasi kalsium intraseluler secara berulang (Ca^{2+} oscillations) sebagai indikator awal adanya aktivasi oosit. Penggunaan ekstrak spermatozoa (ES) menunjukkan peningkatan kadar Ca^{2+} intraseluler secara berulang, mirip induksi sperma pada oosit fertilisasi secara normal. Aktivasi buatan M-II oosit secara *in vitro* yang biasanya dilakukan menggunakan bahan kimia (kalsium, strontium, sikloheksimida, atau 6-dimethylaminopurine, 6-DMAP) atau secara stimulasi elektrik telah menunjukkan hasil bervariasi, relatif rendah, dan parsial.

Injeksi ES dapat mengaktivasi semua oosit babi M-II hingga terbentuk pronuklei dan mampu mengalami *cleavage* hingga 75%, sedangkan oosit yang teraktivasi dengan stimulasi secara elektrik mampu membentuk pronuklei hingga 92% dengan jumlah oosit yang mengalami pembelahan mencapai 60% (Okada *et al.*, 2004). Pada oosit M-II babi dan kuda, terjadi pembelahan sel rekonstruksi setelah transfer inti sel donor fibroblas dengan tingkat keberhasilan yang rendah yaitu antara 0-37% (Choi *et al.*, 2002).

Protein ES diisolasi dari spermatozoa dan dapat digunakan dalam membantu proses *in vitro fertilization* (IVF). Mikroinjeksi ES tidak hanya menginduksi oosit untuk menyempurnakan M-II namun juga menginduksi aktivasi selama eksositosis granula kortikal dan perkembangan blastosit. Mikroinjeksi ES sangat efektif mengaktivasi oosit kuda dengan hasil pembelahan dan produksi embrio yang tinggi (Choi *et al.*, 2002). Protein spermatozoa dengan berat molekul kurang lebih 100 kDa memiliki kemampuan untuk mengaktivasi oosit (Matsuura dan Maeda, 2006).

Tujuan penelitian adalah mengetahui karakteristik serta mempelajari fungsi protein ES dengan berat molekul 100 kDa yang diduga memiliki peran dalam mengaktivasi oosit. Manfaat yang diharapkan dapat mengembangkan metode alternatif dalam meningkatkan maturasi dan IVF melalui suplementasi ES sebagai kandidat aktivator sel yang alami.

MATERI DAN METODE

Karakterisasi ES dan Pengukuran Kadar Protein

Isolasi dilakukan mengacu pada metode yang dilakukan Okada *et al.* (2004). Semen segar kambing

diambil 2 ml dengan konsentrasi antara $900-2500 \times 10^6$ sperma/ml dan dicuci dengan 6 ml *tissue culture medium* (TCM) atau dengan perbandingan 1:3, divorteks dan disentrifus 2500 rpm selama 10 menit, pelet ditambah dengan 3 ml TCM, divorteks dan disentrifus 2500 rpm 10 menit. Supernatan dibuang dan divorteks 10 menit, selanjutnya ditambah 0,5 ml bufer ekstrak dan dilakukan sonikasi dingin 20 menit, 1 ml suspensi disentrifus 9000 rpm 15 menit pada 4°C dua kali. Supernatan diambil 0,5 ml dan disentrifus tiga kali dengan kecepatan 13.000 rpm 15 menit pada 4°C , selanjutnya ditambah 0,5 ml bufer KCl-HEPES dan disimpan pada -80°C (Gopalakrishnan *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2004). Karakterisasi ES dilakukan untuk mengetahui berat molekul menggunakan metode *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE).

Gel yang mengandung pita protein 100 kDa setelah elektroforesis SDS-PAGE dipotong dan dimasukkan ke dalam selofan serta ditambahkan 1,5 ml bufer fosfat 0,1 M dan dielektroelusi pada suhu 4°C dengan arus 20 mA dan tegangan 220 V semalam. Hasil elektroelusi dipresipitasi dengan etanol dingin 1:1 dan diinkubasi pada suhu 4°C selama 10-15 menit, dan disentrifugasi 700 G pada suhu ruang selama 20 menit. Etanol dibuang dan presipitat dikeringkan dengan tisu dan ditambahkan 600 μl bufer fosfat 0,2 M pH 7, dan disimpan dalam freezer -20°C hingga digunakan. Untuk mengetahui konsentrasi protein secara kuantitatif dilakukan spektrofotometri dengan metode Biuret, yaitu mengambil 5 μl sampel ditambahkan 45 μl NaCl fisiologis 0,9% dan 1450 μl Biuret. Presipitasi pada ES dilakukan untuk mendapatkan protein yang lebih pekat, jika sampel protein memiliki kandungan sangat kecil.

Uji aktivasi oosit M-II dan Pengamatan Intensitas Ca^{+2} Intraseluler

Oosit diaspirasi menggunakan *disposable syringe* 10 ml, 21Gx11/2. Seleksi, maturasi, dan inkubasi dilakukan dalam inkubator CO_2 5% suhu 38°C selama 1x24 jam. Oosit dalam drop 100 μl medium maturasi ditutup dengan parafin *oil*. Setiap drop berisi 10-15 oosit *in vitro maturation* (IVM). Pada jam ke-30 oosit yang dimaturasi diamati perkembangan sel-sel kumulusnya dan keberadaan *first polar body* oosit (Tanaka, 2001).

Oosit hasil maturasi diaktivasi menggunakan protein total ES dan protein 100 kDa kambing. Sebelum dipaparkan pada medium aktivasi, oosit dipindahkan ke *washing medium* sebanyak 2 kali. Medium aktivasi berisi 2,5 $\mu\text{g/ml}$ ES dalam TCM-199. Setelah aktivasi selama 2 jam dalam inkubator CO_2 5% suhu 37°C , oosit dicuci dengan medium 3 kali dan dipindahkan ke dalam drop baru. Setelah 48 jam, kultur hasil aktivasi oosit diamati berdasarkan persentase oosit mencapai *cleavage*.

Oosit diaktivasi dengan perlakuan sebagai berikut: 1) P1, penambahan ES total dengan konsentrasi 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 2) P2, penambahan spesifik ES dengan konsentrasi 1,98 $\mu\text{g/ml}$, pemaparan selama 2 jam,

selanjutnya oosit dipindah pada medium baru dan dimasukkan dalam inkubator CO_2 37°C selama 2x24 jam. Pengamatan dilakukan pada oosit yang mengalami *cleavage* dan diamati juga profil intensitas Ca^{+2} dengan menggunakan *confocal laser scanning microscope* (CLSM) dengan teknik *staining* fluo-3, dengan 5 μl fluo-3, 2,5 μM dalam ruang gelap. Data karakterisasi protein spermatozoa kambing dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui protein pada berat molekul 100 kDa, intensitas kalsium, dan jumlah oosit M-II teraktivasi dan mengalami pembelahan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi protein ES kambing

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa kadar protein ES hasil isolasi adalah rendah, sehingga dilakukan presipitasi etanol untuk mendapatkan protein yang lebih pekat. Hasil presipitasi ES 2,90 $\mu\text{g/ml}$, protein 100 kDa kambing diperoleh dari hasil elusi 30 *well*, masing-masing berisi 20 μl ES, sehingga kadar protein 100 kDa rata-rata 0,03 $\mu\text{g/ml}$ setiap *well* (Wahyuni *et al.*, 2004). Hasil *running* SDS-PAGE menunjukkan bahwa ES kambing memiliki 11 pita protein. Munculnya profil pita protein 33,11 kDa pada ES menunjukkan adanya persamaan dengan profil protein sperma manusia, babi, dan hamster yang diteliti oleh Yanagimachi (1994) dan Swann (1996). Protein 33 kDa merupakan *oscillogen* (terdapat pada *sperm factor*) yang dapat memicu osilasi Ca^{2+} (Parrington *et al.*, 1996).

Dari hasil analisis menunjukkan bahwa profil protein ES juga memiliki protein 100,16 kDa. Menurut Matsuura dan Maeda (2006) protein dengan berat molekul berkisar 100 kDa pada sperma babi mengandung materi yang efektif dalam mengaktivasi oosit. Pada penelitian sebelumnya protein ES dengan berat molekul 100,16 kDa dielektroelusi untuk diuji kemampuannya dalam mengaktivasi oosit kambing hasil IVM (Wahyuni *et al.*, 2004). Protein ES ini juga telah diuji aktivitas fosforilasinya dengan uji kinase dengan waktu inkubasi 30 menit dan variasi suhu 35° , 37° , dan 39°C . Variasi suhu dilakukan untuk mengetahui optimum protein kinase pada ES maupun spesifik ES (100 kDa), sebagai pertimbangan suhu yang digunakan selama kultur. Hasil uji aktivitas kinase spesifik ES (100 kDa) kambing $0,0231 \pm 0,0001$ dan ES kambing ($0,0299 \pm 0,0001$). Hal ini mengindikasikan bahwa kemampuan aktivitas protein kinase 100 kDa sebagai inhibitor kinase lebih rendah dibandingkan pada protein ES kambing. Rendahnya nilai aktivitas kinase 100 kDa juga mengindikasikan kemampuan protein tersebut dalam mengaktivasi oosit juga akan rendah dibandingkan dengan menggunakan ES total. Hasil aktivitas fosforilasi pada semua protein tertinggi pada suhu 35°C . Data tersebut dapat dijadikan acuan bahwa protein ES kambing dapat dipaparkan pada medium kultur dengan suhu 37°C , meskipun suhu aktivitas optimum protein ES pada 35°C . Hal ini dilakukan untuk menyesuaikan suhu kultur oosit IVM yang membutuhkan suhu 37°C (Wahyuni *et al.*, 2004).

Tingginya nilai aktivitas kinase menunjukkan bahwa aktivitas fosforilasi juga tinggi seperti dilaporkan oleh Sette *et al.* (1997) bahwa injeksi protein kinase pada oosit tikus matang mampu menginduksi eksositosis kortikal granula, memulai proses meiosis, dan pembelahan. Keberadaan protein kinase sangat dibutuhkan oleh oosit MII, sebab aktivasi oosit bergantung pada *maturation promoting factor* (MPF) inaktif (Fujinami *et al.*, 2004). Protein MPF mengandung protein kinase khususnya protein p34^{cdc2} kinase dan siklin B, sedangkan MPF yang aktif akan memicu pembelahan. Perubahan kadar MPF bergantung pada *cytostatic factor* (CSF) oosit.

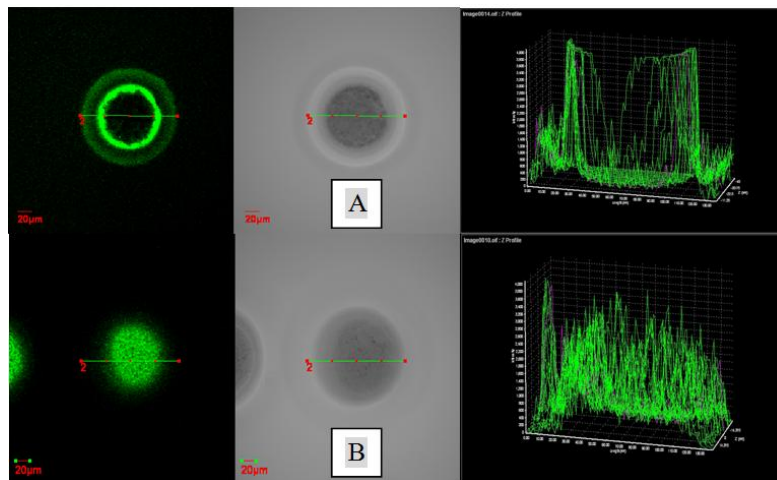
Hasil aktivasi ES pada M-II oosit kambing

Pada perlakuan oosit M-II dengan ES total menyebabkan jumlah pembelahan lebih tinggi dibandingkan protein 100 kDa seperti yang disajikan Tabel 1. Hal ini sesuai dengan data uji aktivitas kinase ES yang menunjukkan lebih tinggi dan sejalan dengan penelitian yang dilakukan Sette *et al.* (1997) bahwa protein kinase dapat menginduksi terjadinya pembelahan. Ekstrak spermatozoa tidak hanya berisi komponen untuk aktivasi oosit namun juga mengandung komponen lain seperti akrosin dan hialuronidase. Adanya protein-protein dalam ES yang kompeten dalam mengaktivasi oosit diduga ES dapat menggantikan agen kimia atau paling tidak sebagai suplemen alami.

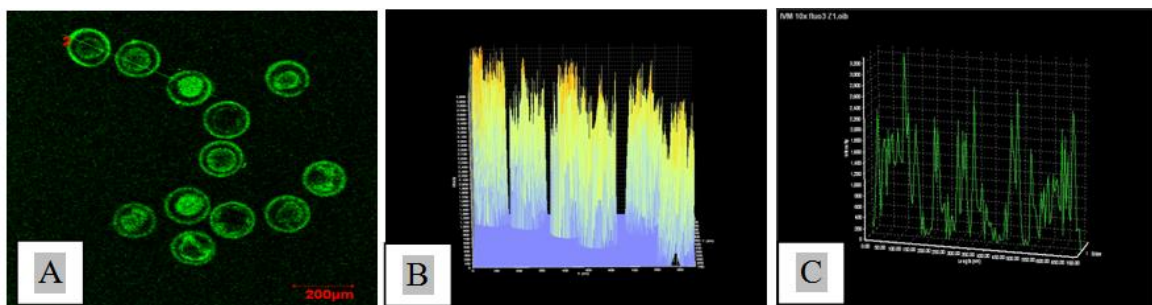
Tabel 1. Hasil aktivasi rata-rata oosit sapi dan kambing dengan *crude sperm extract* (CSE) dan spesifik CSE 100 kDa kambing setelah dikultur selama 2x24 jam dalam inkubator CO₂ 37° C

Perlakuan	Jumlah total oosit (n)	Jumlah oosit cleavage (Rata-rata±SD)
CSE kambing (protein total)	256	112 (43,75±8,5)
CSE 100kDa kambing (protein spesifik)	240	6 (2,00±2,00)
Etanol 7 % + 2 mM 6-DMAP (kontrol positif)	232	172 (74,24±8,2)

Kemampuan protein ES 100 kDa kambing dalam mengaktivasi oosit pada penelitian ini menunjukkan kemampuan aktivasi yang berbeda jika dibandingkan pada oosit babi sesuai hasil penelitian Matsuura dan Maeda (2006). Swann *et al.* (2004) menemukan ES berisi *PI-specific phospholipase C* (PLC), khususnya PLC ζ yang memiliki aktivitas enzimatik dan berkorelasi dengan pelepasan Ca²⁺. Mekanisme ES dalam mengaktivasi pelepasan Ca²⁺ diawali dengan PLC ζ yang terkandung dalam ES (Saunders *et al.*, 2002) menghidrolisis InsP3 (1,4,5-triphosphate), menyebabkan reseptor InsP3 berikatan dengan Ca²⁺ store pada retikulum endoplasma untuk melepaskan Ca²⁺ dan aktivasi oosit (Swann *et al.*, 2004). Keberadaan protein dengan berat 33,11 kDa pada protein CSE kambing juga mendukung tingginya jumlah oosit yang teraktivasi



Gambar 1. Perbedaan profil intensitas kalsium oosit M-II kambing yang tak teraktivasi (A) dan teraktivasi (B). (Oosit yang tidak teraktivasi intensitas kalsium yang tinggi terletak pada bagian tepi sitoplasma, di bagian dalam zona pellucida, sementara yang teraktivasi relatif menyebar ke semua bagian oosit dengan *multipeak* intensitas Ca²⁺)



Gambar 2. Intensitas Ca²⁺ oosit hasil aktivasi ES setelah dikultur 2x24 jam, 200x (A= intensitas yang bervariasi secara individual, B= variasi intensitas digambarkan jelas dengan adanya variasi pada grafik histogram antar oosit)

karena protein 33,11 kDa merupakan protein osilogen yang juga memicu osilasi Ca^{2+} (Parrington *et al.*, 1996).

Perlakuan ES menunjukkan persentase aktivasi (partenogenesis) pada perlakuan ES total lebih tinggi dari pada protein spesifik 100 kDa. Hal ini kemungkinan disebabkan komponen protein yang dimiliki oleh ES khususnya dalam membantu aktivasi oosit dan perkembangan oosit lebih bervariasi dari pada spesifik ES (100 kDa), sebagaimana hasil karakterisasi yang menunjukkan bahwa SE kambing memiliki 11 pita protein. Walaupun persentase perkembangan oosit hasil aktivasi dengan 100 kDa ES kambing menunjukkan nilai yang rendah dibanding dengan persentase pembelahan dengan perlakuan ES kambing, namun adanya perbedaan kadar protein ES total (2,90 $\mu\text{g/ml}$) dan 100 kDa (0,03 $\mu\text{g/ml}$) yang berbeda menunjukkan bahwa protein 100 kDa masih memiliki kemampuan dalam mengaktivasi oosit. Hasil ini sejalan dengan penelitian Matsuura dan Maeda (2006) bahwa dengan menggunakan protein 100 kDa hasil ekstraksi semen babi mampu mengaktivasi oosit.

Profil Intensitas Ca^{2+} intraseluler oosit hasil aktivasi

Profil Ca^{2+} pada oosit kambing merata pada permukaan oosit teraktivasi. Intensitas kalsium tertinggi oosit kambing mencapai nilai hingga 3.500 unit pada panjang gelombang 20 nm. Sebaliknya, pada oosit yang tidak teraktivasi intensitas Ca^{2+} yang tinggi hanya terdapat pada bagian tepi oosit, di bagian dalam dari zona pelusida seperti yang disajikan pada Gambar 1 dan Gambar 2. Tingginya intensitas kalsium oosit hasil aktivasi *crude sperm extract* (CSE) (3500 unit) sejalan dengan penelitian Swann dan Ozil (1994) yang menyatakan bahwa oosit tikus yang telah diinjeksi ES menunjukkan intensitas kalsium yang tinggi. Jika dibandingkan dengan intensitas kalsium oosit hasil fertilisasi normal, intensitas kalsium oosit fertilisasi normal pada waktu 180 menit setelah fertilisasi baru memiliki persamaan nilai intensitas kalsium dengan oosit hasil injeksi ES selama 80 menit. Hal ini menunjukkan bahwa ES memiliki kemampuan yang tinggi dalam memicu peningkatan intensitas kalsium pada oosit setelah aktivasi. Osilasi kalsium masih dibutuhkan oleh oosit yang terfertilisasi hingga terjadinya *cleavage*. Swann *et al.* (2004) menyatakan bahwa kalsium akan memengaruhi teraktivasi oosit untuk berkembang lebih lanjut.

Hasil aktivasi oosit dengan paparan ES secara keseluruhan menunjukkan hasil yang belum optimal, namun dengan waktu paparan 2 jam telah mampu menunjukkan adanya pembelahan. Pengaruh paparan ES terhadap oosit lebih singkat dibanding *cycloheximide* dan 6-DMAP yang membutuhkan waktu lebih dari 2 jam (Ikumi *et al.*, 2003).

KESIMPULAN

Jumlah pembelahan oosit kambing dengan aktivasi menggunakan ES total dan paparan ES 100 kDa masing-masing mencapai pembelahan 43,75 dan 2,00%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada seluruh tim dan mahasiswa S2, S3 juga kepada laboran/teknisi yang membantu kerja di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Choi, Y.H., C.C. Love, Y.G. Chung, D.D. Varner, M.E. Westhusin, R.C. Burghardt, and K. Hinrichs. 2002. Use of piezo-driven direct nuclear injection and activation with stallion sperm extract to produce horse nuclear transfer embryos. **Theriogenology** 58:771-774.
- Fujinami, N., Y. Hosoi, H. Kato, K. Matsumoto, K. Saeki, and A. Iritani. 2004. Activation with ethanol improves embryo development of ICSI-derived oocytes by regulation of kinetics of MPF activity. **J. Reproduct. Developm.** 50:171-178.
- Gopalakrishnan, B., S. Avarinda, C.H. Pawshe, S.M. Totey, S. Nagpal, D.M. Salunke, and C. Shaha. 1998. Studies on glutathione s-transferases important for sperm function: Evidence of catalytic activity-independent functions. **J. Biochem.** 329:231-241.
- Ikumi, S., M. Asada, K. Sawai, and Y. Fukui. 2003. Effect of activation methods for bovine oocytes after intracytoplasmic injection. **J. Reproduct. Developm.** 49:37-43.
- 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.
- Okada, K., K. Miyano, and M. Miyake. 2004. Activation and development of pig oocytes after microinjection of crude sperm extract. **J. Mamm. Ova Res.** 21: 134-140.
- Parrington, J., K. Swann, I.S. Valery, K.S. Abdu, and F.A. Lai. 1996. Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. **Nature** 379:364-368 (Abstract)
- Sette, C., A. Bevilacqua, A. Bianchini, F. Margia, R. Geremia, and P. Rossi. 1997. Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. **Development** 124:2267-2274.
- Swann, K. and J.P. Ozil. 1994. Dynamic of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. **Int. Rev. Cytol.** 152:183-222.
- Swann, K., M.G. Larman, C.M. Saunders, and F.A. Lai. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLC ζ . **Reproduction** 127:431-439.
- Tanaka, H. 2001. **Reproductive Biology and Biotechnology**. Japan International Cooperation Agency, Indonesia.
- Wahyuni, E.A., G. Ciptadi, Aulanni'am, dan B. Siwanto. 2009. Isolasi dan karakterisasi protein *crude sperm extract* (CSE) kambing dan sapi: Uji potensi CSE 100 kDa dalam mengaktivasi sel oosit. **Tesis**. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang
- Yanagimachi, R. 1994. **Mammalian Fertilization in the Physiology of Reproduction**. 2nd ed. E. Knobil and D. Niell (Eds.). Raven Press, New York.