

Aktivasi dan Tingkat Perkembangan Embrio Partenogenetik Mencit Setelah Dipapar *Calcimycin* dan *Ionomycin*

(ACTIVATION AND DEVELOPMENT RATE OF MICE PARTHENOGENETIC EMBRYOS EXPOSED IN CALCIMYCIN AND IONOMYCIN)

Wilmientje Marlene Nalley, Thomas Mata Hine

Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan,
Universitas Nusa Cendana
Jln. Adisucipto, Penfui, Kupang, Nusa Tenggara Timur, 85000,
Telp. 0380881084; E-mail: nalleywm@yahoo.co.id

ABSTRAK

Tujuan penelitian ini adalah menemukan konsentrasi dan lama pemaparan *calcimycin* dan *ionomycin* terbaik pada sel telur mencit dalam rangka optimalisasi produksi embrio partenogenetik. Kegiatan penelitian diawali dengan injeksi mencit betina strain Swiss Webster dengan *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) dan *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) dengan selang waktu penyuntikan 48 jam. Setelah 16 jam pascapenyuntikan hCG dilakukan panen sel telur dengan menggunakan *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (dPBS) sebagai medium pembilas uterus. Untuk memisahkan sel telur dari sel kumulus digunakan enzim hyaluronidase. Sel telur yang berkualitas baik dipaparkan dalam medium aktivasi yaitu *calcimycin* atau *ionomycin*, pada konsentrasi 3, 6, atau 9 μM dan lama pemaparan 1, 4, atau 7 menit, selanjutnya dilakukan diploidisasi menggunakan cytochalasin B 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ selama empat jam pada suhu 37°C, CO₂ 5%. Sel telur yang teraktivasi ditandai oleh adanya pembentukan pronukleus, dicuci tiga kali dalam *Kalium Simplex Optimization Medium* (KSOM) dan selanjutnya dikultur dalam medium yang sama hingga mencapai stadium blastosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sel telur yang diaktivasi pada *calcimycin*, hasil terbaik disajikan pada konsentrasi 6 μM dan lama pemaparan empat menit, dengan tingkat aktivasi sel telur mencapai 96%, *cleavage rate* 82%, dan *blastocyst rate* 28%. Di sisi lain, sel telur yang diaktivasi pada *ionomycin*, hasil terbaik disajikan pada konsentrasi 3 μM dan lama pemaparan empat menit, dalam hal ini tingkat aktivasi sel telur mencapai 82%, *cleavage rate* 64%, dan *blastocyst rate* 4%. Disimpulkan bahwa konsentrasi dan lama pemaparan *calcimycin* terbaik pada sel telur mencit adalah 6 μM selama empat menit, sedangkan *ionomycin* adalah 3 μM selama empat menit.

Kata-kata kunci: embrio partenogenetik mencit, aktivasi, perkembangan, *calcimycin*, *ionomycin*

ABSTRACT

The aim of study was to find out the best concentration and exposure time of *calcimycin* and *ionomycin* in order to produce parthenogenetic embryos. Female Swiss Webster mice were firstly primed with *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG) and *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG) with an interval of 48 hours. Sixteen hours after injection of hCG oocyte was collected by *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (dPBS) as a flushing medium. To separate the eggs from cumulus cells were used hyaluronidase enzyme. The good quality oocytes were incubated in activation medium that is *ionomycin* or *calcimycin* with a concentration of 3, 6, or 9 μM and exposure time 1, 4, or 7 minutes. To yield diploid embryos were used 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cytochalasin B for four hours at 37°C, 5% CO₂. Activated oocytes characterized by the formation of pronuclei washed three times in *Potassium Simplex Optimization Medium* (KSOM) and subsequently cultured in the same medium until blastocyst stage. The results showed that oocytes activated at *calcimycin*, the best results was presented at concentration 6 μM and exposure time four minutes, i.e. activation rate reached 96%, *cleavage rate* 82% and *blastocyst rate* 28%. On the other hand, oocytes activated in *ionomycin*, the best results was presented at concentration 3 μM and exposure time four minutes, i.e. activation rate reached 82%, *cleavage rate* 64% and *blastocyst rate* of 4%. It was concluded that the best concentration and exposure time *calcimycin* on mice oocytes were 6 μM for four minutes, whereas *ionomycin* were 3 μM for four minutes.

Keywords: mice parthenogenetic embryos, activation, development, *calcimycin*, *ionomycin*,

PENDAHULUAN

Pada mamalia, sel telur merupakan satu-satunya sel yang secara alami memiliki kemampuan untuk menghasilkan individu baru melalui perkembangan embrio di dalam uterus. Walaupun demikian, sel telur yang telah mencapai tingkat kematangan yang sempurna akan memasuki masa istirahat ketika berada pada tahap metaphase II (Kharche *et al.*, 2013). Berkembang atau tidaknya sel telur menjadi embrio tergantung pada keberadaan stimulan yang berasal dari spermatozoa melalui proses fertilisasi di dalam ampula tuba Fallopii. Spermatozoa mengaktifkan sel telur dengan memicu osilasi kalsium dalam sitoplasma sel telur. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa kalsium yang diinduksi oleh spermatozoa dipicu oleh *sperm-derived protein factor* yang berdifusi ke dalam sitoplasma sel telur setelah terjadi fusi membran gamet jantan dan betina (Saunders *et al.*, 2002). Studi sebelumnya menunjukkan bahwa phospholipase C (PLC)-zeta terlihat sebagai kandidat utama yang berperan sebagai *sperm factor* mamalia. *Sperm factor* memobilisasi pelepasan kalsium intraseluler sel telur terutama melalui reseptor *inositol tri-phosphate/InsP3* (Saunders *et al.*, 2007).

Aktivasi sel telur mamalia juga dapat dilakukan tanpa spermatozoa tetapi dengan menggunakan berbagai stimulan buatan (Sedmíková *et al.*, 2003; Gasparrini *et al.*, 2004; Meo *et al.*, 2005; Malcuit *et al.*, 2006; Edwards, 2007; Mishra *et al.*, 2008; Paffoni *et al.*, 2008; Murti *et al.*, 2009; Shirazi *et al.*, 2009; Marhendra *et al.*, 2010; Hine *et al.*, 2012; Jena *et al.*, 2012) seperti strontium chloride (Ma *et al.*, 2005), ionomycin (Rascado *et al.*, 2010). Calcimycin ($C_{29}H_{37}N_3O_6$; BM: 523.63 g/mol) atau ionomycin ($C_{41}H_{70}CaO_9$; BM: 747.07 g/mol) adalah dua dari sejumlah stimulan buatan yang mampu meningkatkan konsentrasi kalsium intraseluler melalui mobilisasi kalsium dari tempat penyimpanannya di retikulum endoplasma. Kedua stimulan buatan tersebut telah digunakan untuk memproduksi embrio partenogenetik mamalia, namun baik tingkat aktivasi maupun perkembangan embrio masih sangat rendah (Uranga *et al.*, 1996) yang diduga akibat belum ditemukannya konsentrasi dan lama pemaparan yang optimal dari kedua stimulan tersebut. Penelitian ini dirancang dengan tujuan untuk menemukan konsentrasi

dan periode pemaparan yang optimal pada calcimycin dan ionomycin dalam rangka optimalisasi produksi embrio partenogenetik.

METODE PENELITIAN

Superovulasi dan Koleksi Sel Telur

Superovulasi dilakukan dengan menyuntik mencit Swiss Webster betina yang berumur 8-12 minggu dengan *pregnant mare's serum gonadotropin* (PMSG; Intervet) 5 IU dan *human chorionic gonadotropin* (hCG; Intervet) 5 IU pada selang waktu penyuntikkan 48 jam. Enam belas jam setelah penyuntikkan hCG, mencit dianastesi dan dikorbankan nyawanya dengan metode *cervical dislocation*. Ampula tuba Fallopii dipotong dan ditempatkan dalam larutan *Dulbecco's phosphate buffer saline* (dPBS; Gibco). Setiap ampula disayat dengan ujung jarum suntik untuk mengeluarkan kompleks kumulus-sel telur. Kompleks kumulus-sel telur (Gambar 1A) diaspirasi dengan menggunakan pipet Pasteur, dan ditransfer ke dalam medium yang sama yang disuplementasi dengan hyaluronidase (Sigma) 0,03%, di bawah satu menit. Kompleks kumulus-sel telur selanjutnya dipipet secara berulang untuk mempermudah pemisahan sel telur dari kumulus. Hyaluronidase dihilangkan dengan mencuci sel telur dalam mPBS yang disuplementasi dengan *New Born Calf Serum* (NBCS; Sigma) 1%. Sebelum aktivasi partenogenesis, sel telur dicuci tiga kali dalam medium yang sama dan dilakukan seleksi untuk memisahkan sel telur yang layak dan tidak layak. Seleksi sel telur didasarkan pada kekompakan ikatan sel kumulus yang mengelilingi sel telur, keutuhan zona pelusida, dan keseragaman tampilan sitoplasma sel telur serta adanya *polar body* I (Gambar 1B).

Aktivasi Partenogenesis

Sebanyak 900 sel telur yang sudah matang (memiliki *polar body* I) dan berkualitas baik diacak secara lengkap untuk ditempatkan dalam larutan dPBS berbentuk *drop* 100 μ L yang disuplementasi dengan *calcimycin* atau *ionomycin* dengan konsentrasi 3, 6, 9 μ M dan lama pemaparan 1, 4, atau 7 menit pada suhu ruang. Masing-masing kombinasi perlakuan mendapat 50 oosit. Sel telur dipindahkan dengan pipet Pasteur ke dalam *drop* dPBS, dan selanjutnya ditransfer ke dalam cawan petri

lainnya yang telah diisi dengan medium kultur yang mengandung cytotokalsin B 5 µg/mL dan diinkubasi selama empat jam pada suhu 37°C, CO₂ 5%.

Kultur Embrio

Sel telur yang teraktivasi dan memiliki dua pronukleus (Gambar 2A) dicuci tiga kali dalam drop 20 µL *Potassium Simplex Optimization Medium* (KSOM) yang disuplementasi dengan *fetal bovine serum* (FBS) 10%, dan selanjutnya dikultur dalam medium yang sama hingga stadium blastosis. Kultur dilakukan dalam inkubator dengan kandungan CO₂ 5% pada suhu 37°C. Pergantian medium kultur dilakukan setiap dua hari sambil melakukan pengamatan terhadap profil perkembangan embrio.

Variabel Penelitian

Variabel penelitian yang diukur adalah tingkat aktivasi, *cleavage rate*, dan *blastocyst rate*. Tingkat aktivasi dihitung berdasarkan jumlah sel telur yang mengandung pronukleus, *cleavage rate* diukur berdasarkan jumlah embrio yang mampu berkembang ke stadium dua sel. *Blastocyst rate* dihitung berdasarkan jumlah embrio yang mencapai stadium blastosis yang ditandai oleh adanya pembentukan blastosul di antara sel-sel blastomer.

Rancangan Percobaan dan Analisis Data

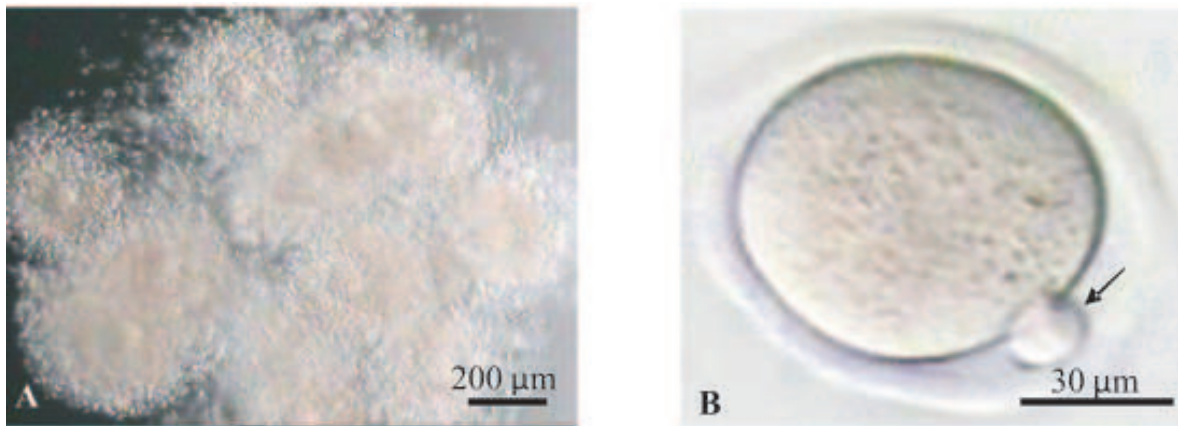
Penelitian dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial 2x3x3. Faktor pertama adalah jenis aktivator partenogenesis (calcimycin, ionomycin), faktor kedua konsentrasi aktivator partenogenesis (3, 6, 9 µM), dan faktor ketiga lama pemaparan (1, 4, 7 menit). Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan lima kali dengan 10 sel telur per ulangan. Data penelitian dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan Uji Duncan. Analisis menggunakan *software* SPSS 19.0 for windows dan *MS office Excell* 2007.

HASIL DAN PEMBAHASAN

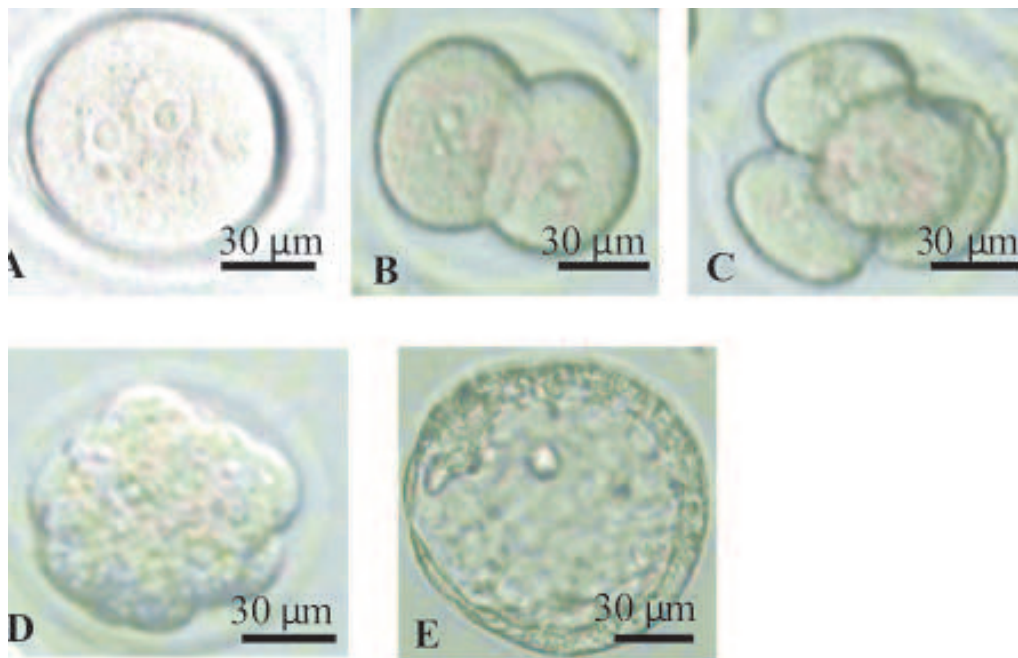
Tingkat aktivasi sel telur yang dipaparkan pada ionomycin dan calcimycin disajikan pada Tabel 1. Tingkat aktivasi sel telur tertinggi yang dipaparkan pada ionomycin dihasilkan pada konsentrasi 3 µM dengan lama pemaparan empat menit. Namun demikian, tidak terdapat perbedaan yang nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan lainnya kecuali dengan konsentrasi

3 µM dengan lama pemaparan satu menit. Walaupun demikian, berdasarkan jumlah embrio yang berkembang sampai stadium *cleavage* (Gambar 2B; Tabel 2), ionomycin 3 µM pada semua periode pemaparan menampilkan hasil sebesar 54 hingga 64% lebih tinggi ($P < 0,05$) dari pada konsentrasi 6 dan 9 µM yaitu 2 hingga 32%. Seiring dengan semakin majunya tingkat perkembangan, embrio yang mencapai tahap blastosis pada konsentrasi 3 µM mengalami penurunan menjadi 2 hingga 4%, namun pada konsentrasi 6 dan 9 µM tidak satupun embrio yang mampu berkembang sampai stadium blastosis (Gambar 2E) yang disebabkan oleh adanya tingkat kematian embrio yang cukup tinggi pada stadium empat sel dan morula (Gambar 2C,D). Hal tersebut menunjukkan bahwa sel telur sangat sensitif terhadap ionomycin sehingga dengan konsentrasi rendah sudah mampu menginduksi aktivasi pada sel telur yang dipaparkan, sedangkan konsentrasi tinggi justru menghasilkan efek yang merugikan. Walaupun persentase sel telur yang teraktivasi cukup tinggi tetapi semua mengalami kematian sehingga tidak ada yang mencapai stadium blastosis.

Di sisi lain, pemaparan sel telur pada calcimycin berkonsentrasi rendah menghasilkan tingkat aktivasi yang rendah terutama ketika periode pemaparan pendek. Sel telur yang dipaparkan pada calcimycin 6 dan 9 µM pada ketiga periode pemaparan menghasilkan tingkat aktivasi berkisar antara 84% hingga 96% lebih tinggi ($P < 0,05$) dari pada yang dipaparkan pada konsentrasi 3 µM yaitu 46% hingga 80% (Tabel 1). Walaupun demikian, embrio hasil pemaparan pada calcimycin 9 µM yang berkembang ke stadium blastosis relatif lebih sedikit ($P < 0,05$) daripada 6 µM terutama pada lama pemaparan empat dan tujuh menit; dan tidak berbeda ($P > 0,05$) dengan 3 µM pada lama pemaparan satu dan empat menit. Namun, dilihat secara umum, calcimycin dengan konsentrasi 6 µM dan lama pemaparan empat menit menampilkan hasil yang lebih tinggi ($P < 0,05$) dari semua kombinasi perlakuan lainnya, dengan jumlah embrio yang mencapai stadium blastosis adalah 28%, sementara pada pasangan perlakuan lainnya berkisar antara 4% hingga 18% (Tabel 3). Hasil ini menunjukkan bahwa calcimycin tidak dapat menghasilkan efek yang optimal pada konsentrasi yang rendah (3 µM) atau konsentrasi tinggi (9 µM). Dilihat secara menyeluruh pada semua kombinasi perlakuan baik dengan calcimycin maupun ionomycin,



Gambar 1. A. Kompleks kumulus-sel telur, B. Sel telur matang (metaphase II). Tanda panah (“) menunjukkan *polar body* I



Gambar 2. Tampilan sel telur dan embrio partenogenetik mencit pascaaktivasi dengan calcimycin dan ionomycin. A: sel telur yang memiliki dua pronukleus setelah aktivasi. B: embrio stadium sel. C: embrio stadium empat sel. D: embrio stadium morula. E: embrio stadium blastosis.

kombinasi perlakuan terbaik adalah calcimycin dengan konsentrasi 6 μM dan lama pemaparan empat menit (Tabel 1-3).

Sel telur yang belum dibuahi spermatozoa secara metabolis sedang berada dalam keadaan istirahat (Ciapa dan Chiri, 2000). Berbagai kejadian fisiologi, biokimia, dan morfologi distimulasi pada saat aktivasi, seperti respirasi, *transporter ion* dan asam amino, sintesis protein, serta aktivasi atau inaktivasi berbagai kinase dan fosfatase (Epel, 1997). Pada sel

telur mamalia, aktivitas *Mitosis Activating Protein* (MAP) kinase (Waskiewicz dan Cooper, 1995) dan *Mitosis Promoting Factor* (MPF) mengalami peningkatan dan mempertahankan sel telur tertahan pada metafase II (Kishimoto, 1999).

Pada sel telur mamalia, peningkatan kalsium intraseluler merupakan sinyal yang bertanggung jawab untuk melanjutkan proses meiosis dan memulai perkembangan embrio; dengan demikian, memainkan peranan penting

Tabel 1. Tingkat aktivasi sel telur (%) pascapemaparan pada calcimycin atau ionomycin pada konsentrasi dan lama pemaparan yang berbeda

Lama pemaparan	Ionomycin			Calcimycin		
	3 μ M	6 μ M	9 μ M	3 μ M	6 μ M	9 μ M
1 menit	32/50 (64 \pm 5,48 ^{GH})	36/50 (72 \pm 8,37 ^{FG})	38/50 (76 \pm 5,48 ^{EF})	23/50 (46 \pm 5,48 ^I)	42/50 (84 \pm 8,94 ^{BCDE})	44/50 (88 \pm 8,37 ^{ABCD})
4 menit	41/50 (82 \pm 8,37 ^{CDEF})	40/50 (80 \pm 10,00 ^{DEF})	31/50 (62 \pm 7,07 ^{DEF})	48/50 (96 \pm 5,48 ^A)	46/50 (92 \pm 10,95 ^{ABC})	47/50 (94 \pm 5,48 ^{AB})
7 menit	38/50 (76 \pm 5,48 ^{EF})	39/50 (78 \pm 8,37 ^{DEF})	40/50 (80 \pm 7,07 ^{DEF})	46/50 (92 \pm 8,37 ^{ABC})	47/50 (94 \pm 5,48 ^{AB})	47/50 (94 \pm 5,48 ^{AB})

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

Tabel 2. *Cleavage rate* (%) embrio pascapemaparan pada calcimycin atau ionomycin pada konsentrasi dan lama pemaparan yang berbeda

Lama pemaparan	Ionomycin			Calcimycin		
	3 μ M	6 μ M	9 μ M	3 μ M	6 μ M	9 μ M
1 menit	27/50 (54 \pm 5,48 ^E)	16/50 (32 \pm 4,47 ^{FG})	5/50 (10 \pm 7,07 ^H)	19/50 (38 \pm 10,95 ^F)	35/50 (70 \pm 7,07 ^{BC})	33/50 (66 \pm 5,48 ^{BCD})
4 menit	32/50 (64 \pm 11,40 ^{BCDE})	12/50 (24 \pm 5,48 ^G)	4/50 (8 \pm 4,47 ^H)	29/50 (58 \pm 4,47 ^{DE})	41/50 (82 \pm 4,47 ^A)	37/50 (74 \pm 13,42 ^{AB})
7 menit	29/50 (58 \pm 8,37 ^{DE})	5/50 (10 \pm 7,07 ^H)	1/50 (2 \pm 4,47 ^H)	30/50 (60 \pm 10,00 ^{CDE})	34/50 (68 \pm 10,95 ^{BCD})	27/50 (54 \pm 5,48 ^E)

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

Tabel 3. *Blastocyst rate* (%) pascapemaparan pada calcimycin atau ionomycin pada konsentrasi dan lama pemaparan yang berbeda

Lama pemaparan	Ionomycin			Calcimycin		
	3 μ M	6 μ M	9 μ M	3 μ M	6 μ M	9 μ M
1 menit	1/50 (2 \pm 4,47 ^{FG})	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	2/50 (4 \pm 5,48 ^{EF})	6/50 (12 \pm 4,48 ^{BCD})	3/50 (6 \pm 5,48 ^{DEFG})
4 menit	2/50 (4 \pm 5,48 ^{FG})	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	5/50 (10 \pm 7,07 ^{CDE})	14/50 (28 \pm 8,37 ^A)	4/50 (8 \pm 4,48 ^{CDEF})
7 menit	1/50 (2 \pm 4,48 ^{FG})	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	0/50 (0 \pm 0,00 ^G)	7/50 (14 \pm 8,94 ^{BC})	9/50 (18 \pm 4,48 ^B)	3/50 (6 \pm 5,48 ^{DEFG})

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada baris dan kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata (P<0,05) antara perlakuan

selama fertilisasi (Stricker, 1999). Pada kejadian fertilisasi normal diperkirakan bahwa spermatozoa menghasilkan *soluble factor* yang dilepaskan ke dalam sel telur setelah terjadi fusi gamet (Runft *et al.*, 2002). Spermatozoa mengandung phospholipase-C-zeta (PLC-zeta) dalam jumlah yang cukup untuk menginduksi peningkatan kalsium pada sel telur (Saunders *et al.*, 2002). Ekspresi PLC-zeta terjadi pada spermatid tetapi tidak terjadi pada tahap spermatogenesis yang lebih awal (Saunders *et al.*, 2002). Penemuan ini menunjukkan bahwa PLC-zeta diekspresikan pada spermatozoa testis dan epididimis. Swann *et al.* (2004) melaporkan bahwa walaupun spermatozoa mengandung PLC-zeta, spermatozoa akan menjadi tidak aktif hingga spermatozoa masuk ke dalam sel telur. Dengan demikian, aktivasi PLC-zeta bukan merupakan satu proses pasif tetapi tergantung pada interaksi dengan faktor-faktor yang terdapat dalam ooplasma (Dozortsev *et al.*, 1997).

Ciri umum proses aktivasi sel telur adalah peningkatan kalsium sitosol di dalam sel telur. Hal tersebut pertama kali didemonstrasikan pada sel telur ikan, bulu babi, dan selanjutnya telah dibuktikan juga pada proses aktivasi pada semua sel telur hewan dan tumbuhan (Runft *et al.*, 2002; Samuel *et al.*, 2001). Kadar kalsium di dalam sel telur mengalami peningkatan dari $\sim 0,1 \mu\text{M}$ menjadi $1 \mu\text{M}$ dan pada hampir semua spesies, ini terjadi sebagai suatu gelombang yang melintasi sel telur (Stricker, 1999). Peningkatan kadar kalsium sangat bermanfaat untuk menunjang pengaktifan kembali siklus sel dalam sel telur. Peningkatan kadar kalsium menyebabkan sel telur memasuki siklus anafase dan menyelesaikan pembelahan meiosis, dan menyebabkan sel telur tersebut mengalami sintesis DNA (Jaffe *et al.*, 2001). Keterkaitan antara peningkatan kadar kalsium dengan kejadian anafase tidak dimengerti sepenuhnya. Namun, diduga melibatkan *calmodulin-dependent protein kinase* (Johnson *et al.*, 1998) yang berperan dalam proteolisis *securin* dan *cyclin* sehingga terjadi proteolisis *cohesin* yang berfungsi mempertahankan kromosom (Stemmann *et al.*, 2001). Hubungan antara peningkatan kadar kalsium dengan sintesis DNA melibatkan inaktivasi MAP kinase (Carroll *et al.*, 2000). Namun, bagaimana kalsium menyebabkan inaktivasi tersebut dan bagaimana inaktivasi MAP kinase menyebabkan sintesis DNA belum diketahui. Pada sel telur vertebrata, kadar kalsium yang meningkat pada saat fertilisasi disebabkan terutama oleh

inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) yang merangsang pelepasan kalsium dari reticulum endoplasma (Jaffe *et al.*, 2001).

Beberapa studi menunjukkan bahwa aktivasi sel telur secara buatan dengan *calcimycin* dan *ionomycin* dapat meningkatkan kalsium intraseluler (Katsuki *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2001) seperti yang terjadi pada saat fertilisasi normal yang selanjutnya menyebabkan aktivasi sel telur (Wang *et al.*, 1998). *Calcimycin* dikenal juga dengan sebutan *calcimycin A23187* atau antibiotik A23187, yang diproduksi pada fermentasi *Streptomyces chartreusensis*. *Calcimycin* memiliki sifat melawan bakteri Gram positif dan jamur; bertindak sebagai divalen kation *ionophore*, yang memungkinkan ion-ion ini dapat melewati membran sel yang umumnya tidak dapat dilewatinya. *Calcimycin* umum digunakan di laboratorium untuk meningkatkan kalsium intraseluler, juga dapat melepaskan fosforilasi oksidatif, suatu proses yang digunakan oleh sel untuk mensintesis *adenosine triphosphate* (ATP) yang selanjutnya digunakan sebagai sumber energi, juga dapat menghambat aktivitas ATPase mitokondria. Dalam penelitian *in vitro*, *calcimycin* digunakan untuk meningkatkan keberhasilan program *intra cytoplasmic sperm injection* (ICSI), dalam hal tersebut *calcimycin* bertindak layaknya akrosom pada spermatozoa, dan memainkan peranan dalam aktivasi setelah ICSI, dengan penggunaan yang direkomendasikan adalah 0,5 microgram/mL (Eftekhar *et al.*, 2012). *Ionomycin* adalah *ionophore* yang diproduksi oleh bakteri *S. conglobatus*. *Ionomycin* umumnya digunakan untuk meningkatkan kalsium intraseluler, menstimulasi produksi berbagai *cytokine* seperti *interferon*, *perforin*, *interleukin-2* (IL-2), dan IL-4.

Dalam penelitian ini, kami menguji *ionomycin* dan *calcimycin* untuk aktivasi sel telur mencit. Walaupun perlakuan dengan *ionomycin* mampu menghasilkan tingkat aktivasi yang cukup tinggi (64-82%) namun *blastocyst rate* atau jumlah embrio yang berkembang hingga stadium blastosis sangat sedikit (0-4%) dibandingkan dengan hasil aktivasi dengan *calcimycin* (4-28%). Dengan demikian diasumsikan bahwa peningkatan kalsium yang diinduksi oleh *ionomycin* tidak cukup untuk menunjang perkembangan embrio hingga stadium lanjut. Menurut Colonna *et al.*, (1989), pemaparan sel telur pada $1 \mu\text{M}$ *ionomycin* menghasilkan $1 \mu\text{M}$ peningkatan

dalam konsentrasi kalsium. Peningkatan ini, lima kali lebih rendah dari pada yang dihasilkan ketika sel telur diaktivasi dengan etanol (Cuthbertson *et al.*, 1981). Sebaliknya, *calcimycin* menginduksi secara signifikan aktivasi partenogenetik yang menghasilkan tingkat perkembangan yang tinggi ke stadium blastosis. Perbedaan antara tiap konsentrasi yang diuji dapat dijelaskan sebagai berikut: konsentrasi *calcimycin* yang rendah tidak dapat meningkatkan konsentrasi kalsium dalam jumlah yang cukup untuk memungkinkan sel telur meneruskan ke meiosis II, pengeluaran *polar body* II dan masuk ke metafase III, dan akhirnya mengalami degenerasi (Vincent *et al.*, 1992).

Eftekhar *et al.* (2012) melaporkan bahwa sebanyak 72,5% sel telur yang dibuahi dengan prosedur ICSI mengalami aktivasi setelah diinkubasi pada *calcimycin*, yang ditandai oleh adanya pembentukan *polar body* II dalam waktu 24 jam. Pada 24 jam berikutnya 62,7% sel telur mencapai stadium dua sel (*cleavage*) dan hanya 11,8% embrio yang berkualitas baik. Nakagawa *et al.* (2001) melaporkan bahwa sekitar 84,9% sel telur manusia mengalami aktivasi dan 64% di antaranya berkembang ke stadium *cleavage* setelah dipaparkan pada *calcimycin*.

SIMPULAN

Tingkat aktivasi sel telur dan perkembangan embrio mencit pada *calcimycin* lebih tinggi daripada *ionomycin*. *Calcimycin* pada konsentrasi 6 μM dengan lama pemaparan empat menit menghasilkan tingkat aktivasi dan perkembangan embrio mencit tertinggi, sedangkan konsentrasi dan lama pemaparan terbaik sel telur di dalam *ionomycin* adalah 3 μM selama empat menit.

SARAN

Penelitian lanjutan perlu dilakukan terutama tentang efek *calcimycin* dan *ionomycin* terhadap kualitas blastosis serta konsentrasi dan lama pemaparan yang optimal pada sel telur mamalia lainnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Dirjen DIKTI yang telah memberikan bantuan dana melalui Penelitian Hibah Bersaing tahun 2011-2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Carroll DJ, Albay DT, Hoang KM, O'Neill FJ, Kumano H, Foltz KR. 2000. The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev Biol* 217: 179-191.
- Ciapa B, Chiri S. 2000. Egg activation: Upstream of the fertilization calcium signal. *Biology of the Cell* 92: 215-233.
- Colonna R, Tatone C, Malgaroli A, Eusebi F, Mangia F. 1989. Effects of protein kinase C stimulation and free Ca^{2+} rise in mammalian egg activation. *Gamete Res* 24: 171-183.
- Cuthbertson KSR, Whitingham DG, Cobbold PH. 1981. Free Ca^{2+} increases in exponential phases during mouse oocyte activation. *Nature* 294: 754-757.
- Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. 1997. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Hum Reprod* 12: 2792-2796.
- Edwards RG. 2007. The significance of parthenogenetic virgin mothers in bonnethead sharks and mice. *Reproductive BioMedicine Online* 15: 12-15.
- Eftekhar M, Mohammadian F, Yousefnejad F, Khani P, Aflatoonian A. 2012. Effect of calcium ionophore on unfertilized oocytes after ICSI cycles. *Iran J Reprod Med* 10(2): 83-86.
- Epel D. 1997. Activation of sperm and egg during fertilization. Dalam: Hoffman JF, Jamieson JJ. (Eds.). *Handbook of Physiology: Cell Physiology*. New York. Oxford Press. Hal. 859-884.

- Gasparrini B, Boccia L, Rosa AD, Palo RD, Campanile G, Zicarelli L. 2004. Chemical activation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes by different methods: Effects of aging on post-parthenogenetic development. *Theriogenology* 62: 1627-1637.
- Hine TM, Boediono A, Supriatna I, Sajuthi D. 2012. Sel kumulus sebagai feeder layer pada kultur stem cells embrionik mencit. *J Veteriner* 13(2): 118-124.
- Jaffe LA, Giusti AF, Carroll DJ, Foltz KR. 2001. Ca²⁺ signalling during fertilization of echinoderm eggs. *Semin Cell Dev Biol* 12: 45-51.
- Jena MK, Malakar D, De AK, Garg S, Akshay YS, Dutta R, Sahu S, Mohanty AK, Kaushik JK. 2012. Handmade cloned and parthenogenetic goat embryos - A comparison of different culture media and donor cells. *Small Ruminant Research* 105: 255-262.
- Johnson J, Bierle BM, Gallicano GI, Capco DG. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: Regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Dev Biol* 204: 464-477.
- Katsuki T, Hara T, Ueda K, Tanaka J, Ohama K. 2005. Prediction of outcomes of assisted reproduction treatment using the calcium ionophore-induced acrosome reaction. *Hum Reprod* 20: 469-475.
- Kharche SD, Birade HS. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4: 170-182.
- Kishimoto T. 1999. Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Dev Biol* 214: 1-8.
- Ma SF, Liu XY, Miao DQ, Han ZB, Zhang X, Miao YL, Yanagimachi R, Tan JH. 2005. Parthenogenetic activation of mouse oocytes by strontium chloride: A search for the best conditions. *Theriogenology* 64: 1142-1157.
- Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. 2006. Calcium oscillation and mammalian egg activation. *Journal of Cellular Physiology* 206: 565-573.
- Marhendra APW, Boediono A. 2010. Parthenogenetic development of mouse oocytes activation using ethanol and 6-DMAP by in vitro. *Veterinaria Medika* 3(1): 69-74.
- Méo SC, Yamazaki W, Leal CL, de Oliveira JA, Garcia JM. 2005. Use of strontium for bovine oocyte activation. *Theriogenology* 63: 2089-2102.
- Mishra V, Misra AK, Sharma R. 2008. A comparative study of parthenogenetic activation and in vitro fertilization of bubaline oocytes. *Animal Reproduction Science* 103: 249-259.
- Murti H, Fahrudin M, Boediono A, Sardjono CT, Setiawan B, Sandra F. 2009. Optimization of activation methods for mouse oocyte using calcium-free CZB medium, SrCl₂, and cytochalasin B in vitro. *Jurnal Kedokteran Maranatha* 8(2): 113-120.
- Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T. 2001. Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 76: 148-152.
- Paffoni A, Brevini TAL, Gandolfi FRG. 2008. Parthenogenetic activation: Biology and applications in the ART laboratory. *Placenta* 29: S121-S125.
- Rascado T da Silva, Martins LR, Minto BW, de Sá Lorena SE, Landim-Alvarenga F da Cruz. 2010. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. *Theriogenology* 74(4): 596-601.
- Runft LL, Jaffe LA, Mehlmann LM. 2002. Egg Activation at Fertilization: Where It All Begins. *Developmental Biology* 245: 237-254.
- Samuel ADT, Murthy VN, Hengartner MO. 2001. Calcium dynamics during fertilization in *C. elegans*. *Bio Med Central Dev Biol* 1:8.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM. 1999. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2⁺) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-3544.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2⁺) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 129: 3533-44.

- Saunders CM, Swann K, Lai FA. 2007. PLCzeta, a sperm-specific PLC and its potential role in fertilization. *Biochem Soc Symp* 74: 23-36.
- Sedmíková M, Burdová J, Petr J, Etrych M, Rozinek J, Jílek F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology* 60: 1609-1620.
- Shirazi A, Bahiraei A, Ahmadi E, Nazari H, Heidari B, Borjian S. 2009. The Effect of the duration of in vitro maturation (IVM) on parthenogenetic development of ovine oocytes. *American Journal of Molecular Biology* 1: 181-191.
- Stemmann O, Zou H, Gerber SA, Gygi SP, Kirschner MW. 2001. Dual inhibition of sister chromatid separation at metaphase. *Cell* 107: 715-726.
- Stricker SA. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology* 211: 157-176.
- Swann K, Larman MG, Saunders CM, Lai FA. 2004. The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction* 127: 431-439.
- Uranga JA, Pedersen RA, Arechaga J. 1996. Parthenogenetic activation of mouse oocytes using calcium ionophores and protein kinase C stimulators. *Int J Dev Biol* 40: 515-519.
- Vincent C, Cheek TR, Johnson MH. 1992. Cell cycle progression of parthenogenetically activated mouse oocytes to interphase is dependent on the level of internal calcium. *J Cell Sci* 103: 389-396.
- Wang E, Taylor RW, Pfeiffer DR. 1998. Mechanism and specificity of lanthanide series cation transport by ionophores A23187, 4-BrA23187, and ionomycin. *Biophys J* 75: 1244-1254.
- Waskiewicz AJ, Cooper JA. 1995. Mitogen and stress response pathways: MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol* 7: 798-805.