

Tingkat Pematuration dan Fertilisasi Oosit Domba yang Dimaturasi dalam Media dengan Imbuhan β -Mercaptoethanol Secara *In Vitro*

(*IN VITRO MATURATION AND FERTILIZATION RATE AT SHEEP OOCYTES MATURATED IN MEDIA WITH β -MERCAPTOETHANOL*)

Okky Adi Bintara¹, Mohamad Agus Setiadi^{1,2},
Ni Wayan Kurniani Karja^{1,2}

¹Program Studi Biologi Reproduksi,

Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor;

²Bagian Reproduksi dan Kebidanan, Departemen Klinik Reproduksi dan Patologi,

Fakultas Kedokteran Hewan, IPB, Jl. Agatis Kampus IPB

Dramaga, Bogor, 16680, Email : karjanwk13@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan β -mercaptoethanol ke dalam medium maturasi pada tingkat maturasi dan fertilisasi *in vitro* oosit domba. Oosit yang telah dikoleksi, dimaturasi dalam medium maturasi tanpa (grup kontrol) atau dengan β -mercaptoethanol konsentrasi 50 atau 100 μ M. Terdapat perbedaan peningkatan persentase oosit yang mencapai fase metaphase II (MII) setelah dikultur di dalam medium maturasi dengan penambahan β -mercaptoethanol baik dengan konsentrasi 50 μ M atau 100 μ M ($p < 0,05$) (62,67%, 77,78%, 82,05% secara berurutan untuk kelompok kontrol, 50 μ M, dan 100 μ M). Antar kelompok tidak ditemukan perbedaan tingkat maturasi antara kelompok 50 μ M dan 100 μ M ($p > 0,05$). Ketika oosit yang telah matang difertilisasi, tidak ditemukan perbedaan yang nyata pada tingkat fertilisasinya pada setiap grup ($p > 0,05$) (70,93%; 77,50%; 69,14% secara berurutan untuk kelompok kontrol, 50 μ M, dan 100 μ M). Simpulan yang dapat ditarik bahwa penambahan β -mercaptoethanol dapat meningkatkan persentase oosit domba mencapai fase metaphase II, dan tidak memengaruhi tingkat fertilisasinya.

Kata-kata kunci : maturasi, β -mercaptoethanol, fertilisasi, *in vitro*

ABSTRACT

The objectives of this study to evaluate the effect of β -mercaptoethanol addition in maturation medium on maturation and fertilization rate of sheep oocytes *in vitro*. Collected oocytes were then matured in maturation medium without (control group) or with β -mercaptoethanol in concentration of 50 μ M or 100 μ M. There was a significant increase in the percentage of oocytes that reached the metaphase II (MII) stage after cultured in maturation medium with β -mercaptoethanol either in concentration of 50 μ M or 100 μ M ($p < 0.05$) (62.67%; 77.78%; 82.05% for control, 50 μ M, and 100 μ M group respectively). However no difference was found in maturation rate of those oocytes in 50 μ M and 100 μ M groups ($p > 0.05$). When matured oocytes were fertilized, no difference was found on fertilization rate among the groups ($P > 0.05$) (70.93%; 77.50%; 69.14% for control, 50 μ M and 100 μ M group respectively). These data indicated that the addition of β -mercaptoethanol increased the percentage of sheep oocytes that reached the MII stage *in vitro*, but had no effect on the fertilization rate.

Keywords : maturation, β -mercaptoethanol, fertilization, *in vitro*

PENDAHULUAN

Tingkat keberhasilan produksi embrio *in vitro* sangat tergantung pada proses inkubasi selama pematangan oosit, fertilisasi, dan kultur embrio. Umumnya selama proses kultur baik oosit maupun embrio, dipapar ke dalam kondisi dengan konsentrasi O₂ setara dengan konsentrasi O₂ di udara (sekitar 20%). Secara *in vivo* perkembangan oosit dan embrio di dalam organ reproduksi betina berada dalam konsentrasi oksigen yang lebih rendah daripada di udara yaitu hanya berkisar 5% (Mastroianni dan Jones, 1965; Bavister, 1995). Tingginya konsentrasi O₂ pada proses kultur *in vitro* dapat menyebabkan meningkatnya metabolisme oksigen sehingga terjadi peningkatan kadar radikal bebas *reactive oxygen species* (ROS) seperti *superoxide anions* (O₂⁻), *hydroxyl radicals* (OH), dan *hydrogen peroxide*/H₂O₂ (Agarwal *et al.*, 2003).

Radikal bebas dalam jumlah yang normal secara fisiologi berfungsi membantu dalam proses proliferasi dan diferensiasi sel (Covarrubias *et al.*, 2008). Namun, apabila jumlahnya berlebihan dapat menimbulkan efek yang negatif seperti kerusakan pada *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan apoptosis (Gupta *et al.*, 2009). Sebagian besar ROS dihasilkan dari proses respirasi yang terjadi pada mitokondria dan di dalam peroksisom, dan ROS terbentuk sebagai hasil degradasi asam lemak rantai panjang. Untuk mencegah efek negatif dari paparan O₂ yang berlebihan selama periode kultur oosit/embrio, beberapa penelitian dilakukan dengan penambahan antioksidan ke dalam media kultur seperti penambahan glutathion (Kim *et al.*, 1999), sisteamin, β -*mercaptoethanol*, sistein, dan sistin (De Matos dan Furnus, 2000). Penambahan antioksidan dipercaya dapat mengurangi terbentuknya radikal bebas sehingga mendukung perkembangan embrio lebih baik.

Senyawa β -*mercaptoethanol* merupakan antioksidan yang mempunyai bobot molekul senyawa thiol yang ringan dan dapat meningkatkan glutathion (GSH) intraseluler pada tikus (Takahashi *et al.*, 1993), dan pada sapi (De Matos dan Furnus, 2000), sehingga memberikan efek positif pada proses maturasi oosit dan perkembangan embrio secara *in vitro*. Glutathion adalah senyawa utama non *sulfidril* protein dalam sel mamalia dan berperan penting dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif (Pastore *et al.*, 2003). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan menilai tingkat maturasi dan

fertilisasi oosit domba secara *in vitro* yang dimaturasi dalam media yang ditambahkan β -*mercaptoethanol*.

METODE PENELITIAN

Koleksi dan Maturasi Oosit Secara *In Vitro*

Ovarium domba diperoleh dari Rumah Potong Hewan, Kampung Cikanyong, Desa Citaringgul, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor. Ovarium dibawa ke laboratorium dalam medium 0,9% NaCl yang ditambahkan 100 IU/mL *penicillin* dan 100 μ g/mL *streptomycin* pada suhu 35-37°C. Oosit dikoleksi dengan menggunakan metode pencacahan (*slicing*) dalam medium *phosphate buffered saline* (PBS) yang ditambahkan dengan 0,3% *bovine serum albumin*/BSA (Sigma, USA) dan 100 IU/mL *penicillin* dan 100 μ g/mL *streptomycin*. Oosit yang dikoleksi kemudian diseleksi berdasarkan morfologinya, hanya oosit yang mempunyai sitoplasma yang homogen dengan sel kumulus lebih dari tiga lapis yang digunakan. Oosit kemudian dicuci dalam medium maturasi sebanyak dua kali dan dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan. Media maturasi terdiri dari medium *Tissue Culture Medium* (TCM) 199 (Sigma, USA) ditambahkan 0,4% BSA, 2 IU/mL *Follicle Stimulating Hormone* (FSH), 2 IU/mL *human Chorionic Gonadotrophin* (hCG), dan 10 μ g/mL *gentamycin* (Sigma, G-1264) tanpa β -*mercaptoethanol* (kelompok kontrol) atau dengan β -*mercaptoethanol* dengan konsentrasi 50 μ M (kelompok-50) dan 100 μ M (kelompok-100). Oosit dimaturasi di dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 39°C selama 24 jam.

Evaluasi Status Inti Oosit

Setelah 24 jam diinkubasi, oosit dicuci dan dihilangkan semua sel kumulusnya dengan bantuan 0,25% enzim *hyaluronidase* dengan cara dipipet berulang-ulang. Oosit kemudian diletakkan pada *drop* KCl 0,7% di atas gelas objek, lalu difiksir dengan menggunakan *cover glass* yang telah diberi bantalan *paraffin* dan *vaselin* pada kedua tepinya. Preparat tersebut dimasukkan dalam larutan fiksasi yang mengandung asam asetat dan ethanol dengan perbandingan 1:3 selama 48-72 jam. Oosit kemudian diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* untuk selanjutnya dilakukan pengamatan morfologi dengan mikroskop fase kontras

(Olympus IX 70, Jepang). Status inti oosit dinilai berdasarkan tahap pembelahan meiosis meliputi tahap *germinal vesicle* (GV), tahap *metaphase* I (MI), tahap *anaphase* (A), *telophase* (T), dan tahap *metaphase* II (MII). Oosit dikategorikan sebagai oosit yang telah matang jika telah berada pada tahap MII.

Fertilisasi Secara *In Vitro*

Semen beku domba dicairkan kembali dalam air hangat pada suhu 37°C selama 30 detik. Semen kemudian dicuci dalam medium fertilisasi dengan disentrifugasi pada 363 x g selama lima menit. Setelah supernatan dibuang, *pellet* spermatozoa diencerkan dengan medium fertilisasi, dihitung konsentrasinya menggunakan kamar hitung Neubauer untuk membuat konsentrasi akhir spermatozoa sebanyak 5×10^6 per mL. Spermatozoa yang telah disiapkan, kemudian ditempatkan dalam bentuk *drop* masing-masing sebanyak 100 μ L pada cawan petri (5-10 oosit/*drop*). Sebelum dilakukan fertilisasi *in vitro*, oosit yang telah dimaturasi dari setiap kelompok perlakuan dicuci sebanyak dua kali di dalam medium fertilisasi, selanjutnya oosit dipindahkan ke dalam *drop* yang berisi spermatozoa untuk kemudian diinkubasi selama 14 jam dalam inkubator 5% CO₂ dengan suhu 39°C.

Evaluasi tingkat fertilisasi dilihat berdasarkan terbentuknya pronukleus dengan pewarnaan *aceto orcein* seperti pada metode untuk melihat status inti oosit. Tingkat fertilisasi adalah perbandingan jumlah oosit yang terfertilisasi (ditandai dengan terbentuknya pronukleus) dengan jumlah keseluruhan sel telur dari masing-masing kelompok perlakuan.

Analisis Data

Data berupa persentase status inti oosit yaitu tahap GV, MI, A/T, dan MII dan data persentase tingkat fertilisasi dianalisis dengan sidik ragam dan dilanjutkan dengan uji Duncan (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

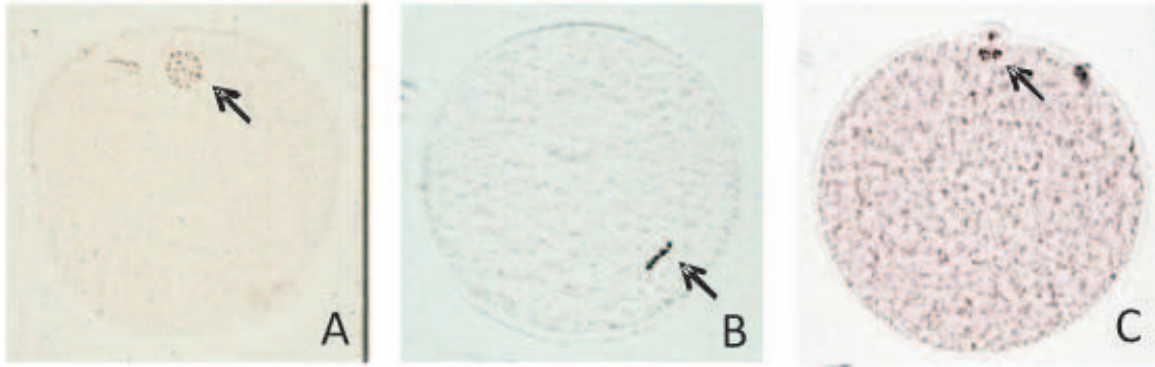
Hasil penelitian menunjukkan bahwa oosit yang berhasil mencapai tahap MII berkisar antara 62,67% sampai 82,05% (Tabel 1). Gambar perubahan inti oosit selama proses pematangan disajikan pada Gambar 1. Oosit yang dimaturasi pada media dengan penambahan β -mercaptoethanol baik pada konsentrasi 50 μ M maupun

100 μ M menunjukkan perkembangan sampai tahap MII yang lebih baik dari pada oosit pada kelompok kontrol ($P < 0,05$). Persentase oosit yang mencapai MII pada media yang ditambahkan α -mercaptoethanol dengan konsentrasi 50 μ M dan 100 μ M tidak berbeda nyata ($P > 0,05$).

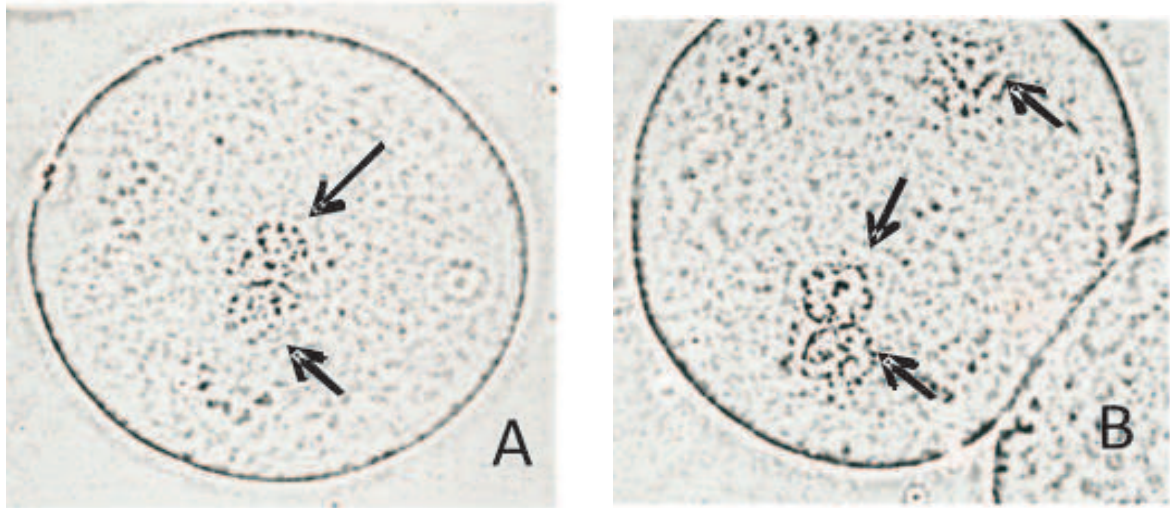
Data yang diperoleh dalam penelitian ini mengindikasikan penambahan β -mercaptoethanol pada medium maturasi dapat meningkatkan secara nyata jumlah oosit yang mencapai tahap MII.

Metabolisme oksigen dalam mitokondria dapat menghasilkan radikal bebas ROS seperti *superoxide anions* (O₂), *hydroxyl radicals* (OH), dan *hydrogen peroxide* (H₂O₂). Selain itu, ROS juga terbentuk sebagai hasil degradasi asam lemak rantai panjang di dalam peroksisom. Produksi ROS yang dihasilkan pada proses maturasi oosit secara *in vivo* dapat diminimalisir dengan adanya cairan folikel dan cairan oviduk. Pada cairan folikel terkandung *sisteamin* (CSH) yang berfungsi untuk melindungi sel dari radiasi *ionizing* dan mengikat *hydroxyl radicals* (OH). Selain itu, pada cairan folikel juga terdapat melatonin dan antioksidan enzim seperti *superoxide dismutase* (SOD), *glutathion peroksidase* (GPX) dan *catalase* (Mayo *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2004). Melatonin berfungsi melindungi sel dari peroksidasi lipid, kerusakan protein, dan kerusakan inti DNA (Chen *et al.*, 2005; Ortega-Guiterrez *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2000; Yamamoto dan Mohanan, 2002).

Penambahan β -mercaptoethanol pada konsentrasi 50 μ M dan 100 μ M dalam medium maturasi pada penelitian ini menghasilkan peningkatan persentase oosit yang mencapai MII dibandingkan oosit yang dimaturasi tanpa β -mercaptoethanol. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Caamano *et al.* (1996) dan Lim *et al.* (1996), bahwasanya penambahan β -mercaptoethanol memberikan efek positif pada proses pematangan oosit sapi secara *in vitro*. Pada oosit kerbau yang dimaturasi dengan menambahkan β -mercaptoethanol sebanyak 25 μ M ke dalam medium maturasi dapat meningkatkan tingkat maturasi oosit (Ullah *et al.*, 2006), sedangkan menurut Takahashi *et al.* (2002), penambahan β -mercaptoethanol sebanyak 50 μ M ke dalam medium kultur dapat meningkatkan perkembangan embrio selama masa inkubasi. Senyawa β -mercaptoethanol dapat meningkatkan glutathione (GSH) intraseluler pada tikus (Takahashi *et al.*, 1993), babi (Abeydeera *et al.*, 1998), dan sapi (De Matos dan Furnus,



Gambar 1. Perubahan inti oosit selama proses pematangan dengan pembesaran 200 kali, (A) Oosit pada tahapan *metaphase* I ditandai dengan adanya kromosom homolog yang berderet di bidang ekuator; (B) Oosit pada tahapan *anaphase* I atau *telophase* I ditandai dengan kromosom homolog mulai tertarik pada kutubnya; (C) Oosit pada tahapan *metaphase* II yang ditandai dengan terbentuknya badan kutub menandakan oosit yang telah matang



Gambar 2. Gambaran pembentukkan pronukleus setelah fertilisasi *in vitro* dengan pembesaran 200 kali, (A) Oosit dengan dua pronukleus terfertilisasi secara normal; (B) Oosit dengan tiga pronukleus terfertilisasi lebih dari satu spermatozoa (polyspermi)

2000) sehingga memberikan dampak positif dalam pematangan oosit. Senyawa β -mercaptoethanol dilaporkan juga dapat mengubah sistin menjadi sistein serta melindungi sistein dari kerusakan oksidatif akibat tingginya konsentrasi oksigen selama masa maturasi oosit (Takahashi *et al.*, 2002). Sistein berfungsi sebagai antioksidan yang bekerja langsung melindungi sel. Keberadaan sistein sangat penting dalam sintesis GSH karena merupakan substrat dalam proses siklus *D-Glutamyl*, dalam hal ini sistein dikatalisasi oleh *D-glutamylcystein synthetase*, kemudian hasil sintesis ini dibawa ke dalam sel melalui sistem transportasi *Alanin-Serin-Cystein/ASC*

(Furnus *et al.*, 2007). Adanya GSH, antioksidan enzim *gluthation peroxidase* (GPX), mempercepat proses reduksi *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *organic hydroperoxides* (ROOH) menjadi molekul yang kurang berbahaya dan dikonversi menjadi *gluthation disulfide* (GSSG), dan GSSG direduksi oleh *gluthation reduktase* dengan adanya *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* (NADPH) menjadi dua molekul *gluthation* (Luberda 2005).

Persentase oosit yang terfertilisasi pada penelitian ini berkisar antara 69-77%. Penambahan β -mercaptoethanol pada penelitian ini tidak menunjukkan pengaruh yang nyata ($P>0,05$) terhadap tingkat fertilisasi

Tabel 1. Tingkat maturasi inti oosit domba pada berbagai tingkatan konsentrasi $\hat{\alpha}$ -mercaptoethanol

Kelompok	Jumlah oosit yang dimaturasi	Status inti (%)				
		GV	M-I	A/T	M-II	Degenerasi
$\hat{\alpha}$ ME-0	75	0 (0)	19 (25,33) ^a	2 (2,67)	47 (62,67) ^a	7 (9,33)
$\hat{\alpha}$ ME-50	72	1 (1,39)	10 (13,89) ^{a,b}	1 (1,39)	56 (77,78) ^b	4 (5,56)
$\hat{\alpha}$ ME-100	78	0 (0)	7 (8,97) ^b	5 (6,41)	64 (82,05) ^b	2 (2,56)

Keterangan : β ME-0 = β -mercaptoethanol-0 μ M; β ME-50 = β -mercaptoethanol-50 μ M; β ME-100 = β -mercaptoethanol 100 μ M. GV: *Germinal Vesicle*; M-I: *Metaphase I*; A/T: *Anaphase/Telophase*; M-II: *Metaphase II*

^{a,b} Superscrip yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang nyata P<0.05

Tabel 2. Tingkat fertilisasi *in vitro* oosit domba pada berbagai tingkatan konsesntrasi β -mercaptoethanol

Kelompok	Jumlah oosit yang difertilisasi	Total oosit terfertilisasi (%)	Pembentukan pronukleus (%)	
			2PN	>2PN
$\hat{\alpha}$ ME-0	86	61 (70,93)	45 (52,33)	16 (18,60)
$\hat{\alpha}$ ME-50	80	62 (77,50)	43 (53,75)	19 (23,75)
$\hat{\alpha}$ ME-100	81	56 (69,14)	38 (46,91)	18 (22,22)

Keterangan : β ME-0 = β -mercaptoethanol-0 μ M; β ME-50 = β -mercaptoethanol-50 μ M; β ME-100 = β -mercaptoethanol 100 μ M. PN: Pronukleus

pada oosit yang dimaturasi pada medium dengan β -mercaptoethanol (Tabel 2). Hasil dari penelitian ini sejalan dengan penelitian Abeydeera *et al.* (1998) yang melaporkan bahwa walaupun penambahan β -mercaptoethanol ke dalam medium maturasi oosit berpengaruh terhadap maturasi oosit, tetapi tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap tingkat fertilisasi oosit babi secara *in vitro*.

Gambaran perkembangan pronukleus setelah fertilisasi *in vitro* baik pada medium yang ditambahkan β -mercaptoethanol maupun yang tidak ditambahkan seperti disajikan pada Gambar 2.

Pada penelitian ini ditemukan juga oosit yang memiliki pronukleus lebih dari dua buah, banyaknya oosit yang mengalami polispermi berkisar antara 18,6 sampai 23,75%. Tingginya tingkat polispermi pada domba dan kambing merupakan masalah utama dalam proses fertilisasi *in vitro*, besarnya mencapai 20% dari jumlah oosit yang difertilisasikan (Slavik *et al.*, 2005). Kejadian polispermi pada sistem kultur *in vitro* belum dipahami secara jelas.

Penelitian pada hamster menyatakan bahwa pada sistem kultur *in vitro* kemungkinan membran vittelin oosit tidak cukup cepat untuk memblok masuknya spermatozoa (Barros dan Yanagimachi, 1972). Penjelasan lain dari kejadian polispermi pada kultur *in vitro* pada beberapa spesies disebabkan karena tingginya konsentrasi spermatozoa yang digunakan dibandingkan dengan keadaan *in vivo* (Suarez 2007). Hal ini dibuktikan dengan menurunnya tingkat polispermi ketika konsentrasi spermatozoa yang digunakan untuk fertilisasi *in vitro* dikurangi (van der Ven *et al.*, 1985; Coy *et al.*, 1993; Abeydeera dan Day, 1997).

SIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa penambahan antioksidan β -mercaptoethanol meningkatkan jumlah oosit yang mencapai tahap MII, namun pengaruhnya terhadap tingkat fertilisasi pada penelitian ini belum kelihatan.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang kualitas embrio yang dihasilkan dari oosit yang dimaturasi pada medium dengan β -mercaptoethanol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada seluruh staf Rumah Potong Hewan khusus domba, Kampung Cikanyong, Desa Citaringgul, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor yang telah membantu dalam menyediakan ovarium selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeydeera LR, Day BN. 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozenthawed ejaculated spermatozoa. *Biology of Reproduction* 57: 729-734
- Abeydeera LR, Wang WH, Cantley TC, Prather RS, Day BN. 1998. Presence of β -mercaptoethanol can increase the glutathione content of pig oocytes matured in vitro and the rate of blastocyst development after in vitro fertilization. *Theriogenology* 50:747-756
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *International Journal Fertility and Sterility* 79: 829-843
- Barros C, Yanagimachi R. 1972. Polyspermy-preventing mechanisms in the golden hamster egg. *The Journal of Experimental Zoology* 180: 251-265
- Bavister BD. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction* 1: 91-148
- Caamano JN, Ryoo ZY, Thomas JA, Youngs CR. 1996. β -Mercaptoethanol enhances blastocyst formation rate of bovine in vitro-matured/in vivo-fertilized embryos. *Biology of Reproduction* 55: 1179-1184
- Chen LJ, Gao YQ, Li XJ, Shen DH, Sun FY. 2005. Melatonin protects against MPTP/MPP+ -induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. *Journal of Pineal Research* 39(1): 34-42
- Covarrubias L, Hernandez-Garcia D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregon S. 2008. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?. *Developmental Biology* 320: 1-11
- Coy P, Martinez E, Ruiz S, Vazquez JM, Roca J, Mat'as C. 1993. Sperm concentration influences fertilization and male pronuclear formation in vitro in pigs. *Theriogenology* 40: 539-546
- De Matos DG, Furnus CC. 2000. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine in vitro maturation on embryo development: effect of β -mercaptoethanol, cysteine and cystine. *Theriogenology* 53: 761-771
- Furnus CC, de Matos DG, Picco S, Peral Garc'ya P, Inda AM, Mattioli G, Errecalde AL. 2007. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. *Animal Reproduction Science* 109: 88-99
- Gupta S, Malhotra N, Sharma D, Chandra A, Agarwal A. 2009. Oxidative stress and its role in female infertility and assisted reproduction: Clinical implication. *International Journal Fertility and Sterility* 2(4): 147-164
- Kim IH, Van Langendonck A, Van Soom A. 1999. Effect of exogenous glutathione on the in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 52: 537-547
- Lim JM, Liou SS, Hansel W. 1996. Intracytoplasmic glutathione concentration and the role of β -mercaptoethanol in preimplantation development of bovine embryos. *Theriogenology* 46: 429-439
- Luberda Z. 2005. The role of glutathione in mammalian gametes. *Biology of Reproduction* 5(1): 5-17
- Mastroianni L, Jones R. 1965. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. *Journal of Reproduction Fertility* 39: 99-102

- Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, Rodriguez C. 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and Molecular Life Science* 59(10): 1706-1713
- Ortega-Gutierrez S, Fuentes-Broto L, Garcia JJ, Lopez-Vicente M, Martinez- Ballarin E, Miana-Mena FJ, Millan-Plano S, Reiter RJ. 2007. Melatonin reduces protein and lipid oxidative damage induced by homocysteine in rat brain homogenates. *Journal of Cellular Biochemistry* 102(3): 729-735
- Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta* 333(1): 19-39
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, Reiter RJ. 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research* 36(1): 1-9
- Slavik T, Libik M, Wierzchos E, Fulka J. 2005. An attempt to reduce polyspermic penetration in lamb oocytes. *Folia Biologica* 51: 34-39
- Steel RGD, Torie JH. 1993. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan Bambang Sumantri. Jakarta. PT Gramedia.
- Suarez SS. 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reproduction, Fertility, and Development* 19: 103-110
- Takahashi M, Nagai T, Hamano S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A. 1993. Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 49: 228-232
- Takahashi M, Nagai T, Okamura N, Takahashi H, Okano A. 2002. Promoting effect of beta-mercaptoethanol on in vitro development under oxidative stress and cystine uptake of bovine embryos. *Biology of Reproduction* 66: 562-567
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Cabrera J, Burkhardt S, Phillip T, Gitto E, Karbownik M, Li QD. 2000. Melatonin suppresses autoxidation and hydrogen peroxide-induced lipid peroxidation in monkey brain homogenate. *Neuro Endocrinol Letters* 21(5): 361-365
- Ullah I, Samina J, Sajjab AS, Khalid F. 2006. Effect of the α -mercaptoethanol on Nili Ravi Buffalo Oocytes During *In Vitro* Maturation. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 5(5): 380-385
- Van Der Ven HH, Al-Hasani S, Diedrich K, Hamerich U, Lehmann F, Krebs D. 1985. Polyspermy in in vitro fertilization of human oocytes: frequency and possible causes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 442: 88-95
- Yamamoto HA, Mohanan PV. 2002. Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide *in vivo* and *in vitro*. *Toxicology* 179(1-2): 29-36