

Kafein dalam Medium Maturasi Meningkatkan Fertilisasi dan Menekan Frekuensi Polispermi Oosit Domba dengan Maturasi Diperpanjang

(CAFFEINE SUPPLEMENTATION IN MATURATION MEDIUM IMPROVE NORMAL FERTILIZATION AND REDUCED THE FREQUENCY OF POLYSPERMY IN SHEEP OOCYTES WITH THE MATURATION PROLONGED)

**Reski Adelia¹, Ni Wayan Kurniani Karja^{1,2},
Mohamad Agus Setiadi^{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,
Jawa Barat 16680 Indonesia,

Telp: (0251) 8626460, Fax: (0251) 8623940

*Penulis untuk korespondensi: setiadi03@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kinetika maturasi inti dan efektivitas suplementasi kafein pada medium maturasi terhadap tingkat fertilisasi oosit domba secara *in vitro*. Penelitian tahap I oosit dimaturasi selama 16 (M-16), 20 (M-20), 24 (M-24), dan 28 (M-28) jam untuk mengevaluasi kinetika maturasi inti oosit. Penelitian tahap II, oosit dimaturasi selama 24 jam (M-24) dan 28 jam (M-28) tanpa kafein (kelompok M-24 dan M-28) atau dengan penambahan kafein pada empat jam sebelum akhir periode maturasi pada oosit yang dimaturasi selama 24 jam (M24-Kaf-4) dan 28 jam (M28-Kaf-4), atau delapan jam (M28-Kaf-8) sebelum akhir periode maturasi pada oosit yang dimaturasi selama 28 jam. Hasil penelitian tahap I menunjukkan, 27,6% oosit berada pada tahap metafase II (MII) pada jam ke-16. Persentasi oosit MII meningkat secara signifikan setelah jam ke-20 (44,8%) hingga jam ke-24 (88,9%) periode maturasi ($P<0,05$) akan tetapi tidak ditemukan adanya peningkatan ketika periode maturasi diperpanjang hingga 28 jam (89,3%) ($P<0,05$). Namun demikian, jumlah oosit dengan dua pronukleus (2PN) lebih banyak pada kelompok M-24 dibandingkan dengan kelompok M-28 ($P<0,05$) dan kejadian polispermi meningkat pada oosit kelompok M-28 ($P<0,05$). Tidak ditemukan adanya perbedaan yang signifikan pada tingkat fertilisasi total antar perlakuan kecuali pada kelompok M28-Kaf-8 ($P<0,05$). Ketika kafein ditambahkan pada empat jam sebelum akhir periode maturasi secara signifikan dapat menurunkan kejadian polispermi dan meningkatkan jumlah oosit 2PN pada kelompok M-28 ($P<0,05$). Dapat disimpulkan bahwa kinetika maturasi inti oosit domba menunjukkan ketidakseragaman waktu yang dibutuhkan oleh oosit untuk mencapai tahap MII dan kafein dapat meningkatkan fertilisasi normal dan menurunkan frekuensi polispermi pada oosit ketika periode maturasi diperpanjang

Kata-kata kunci: oosit; domba; kafein; *aging*; maturasi; fertilisasi

ABSTRACT

The objective of this study were to determine kinetic of nuclear maturation and the efficacy of caffeine supplementation in maturation medium on fertilization rate of sheep oocytes *in vitro*. In the first experiment, oocytes were matured for 16 (M-16), 20 (M-20), 24 (M-24), 28 (M-28) h to assessed the kinetic of oocytes nuclear maturation. In the second experiment, oocytes were matured for 24 h (M-24) or 28 h (M-28) without (M-24 or M-28 groups) or with caffeine supplementation at 4 h before the end of maturation period of oocytes matured for 24 h (M24-Kaf-4) and 28 h (M28-Kaf-4), or 8 h (M28-Kaf-8) before the end of

maturation period of oocytes matured for 28 h. Result of the first experiment, 27.6% of oocytes were in metaphase II (MII) at 16 h. The percentage of MII oocytes significantly increased after 20 h (44.8%) to 24 h (88.9%) of maturation period ($P < 0.05$), but the increasing was not found when the maturation period was prolonged until 28 h (89.3%) ($P > 0.05$). However the number of oocytes with two pronucleus (2PN) was higher in group M-24 compared than that of M-28 group ($P < 0.05$) and incidence of polyspermy increased in oocytes of M-28 group ($P < 0.05$). No significant differences was found in the total of oocytes fertilized among the group except of group M28-Kaf-8 ($P > 0.05$). When caffeine was supplemented at 4 h before the end of maturation period a significantly reduced the incidence of polyspermy and increased the number of oocytes with 2PN in oocytes of M-28 group ($P < 0.05$). In conclusion, the kinetic of nuclear maturation in sheep oocytes showed there was a variation in time required by oocytes to reach MII phase and caffeine improve normal fertilization and reduced the frequency of polyspermy on oocytes when the maturation period prolonged.

Key words: oocytes; sheep; caffeine; aging; maturation; fertilization

PENDAHULUAN

Produksi embrio *in vitro* (PEIV) adalah salah satu teknologi reproduksi berbantuan yang terdiri dari tiga tahapan yaitu maturasi *in vitro* (IVM), fertilisasi *in vitro* (IVF), dan kultur *in vitro* (IVC) (Gordon, 2003; Rahman *et al.*, 2008; Hegab *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2011; Sreenivas *et al.*, 2014). Oosit yang dikoleksi untuk kemudian dimaturasi *in vitro* distimulasi untuk mencapai pertumbuhan yang sempurna dan mengalami maturasi inti sampai mencapai tahap metafase II (MII) (Setiadi dan Karja, 2013). Meskipun telah dilakukan seleksi morfologi berdasarkan kekompakan sel kumulus dan sitoplasma yang homogen, akan tetapi waktu yang diperlukan oosit untuk mencapai tahap MII oleh oosit yang dikoleksi seringkali tidak bersamaan, seperti pada kucing 24-30 jam (Nagano *et al.*, 2008), anjing 24-72 jam (Suzukamo *et al.*, 2009), babi 30-48 jam (Somfai *et al.*, 2004), dan unta 16-44 jam (Wani dan Nowshari, 2005). Variasi perbedaan waktu tersebut kemungkinan disebabkan oleh perbedaan dalam tahap pertumbuhan pada saat oosit dikoleksi (Gordon, 2003; Alm *et al.*, 2005; Sirard, 2011; Muttaqin *et al.*, 2015). Ketidakteraturan tersebut akan memengaruhi keberhasilan proses fertilisasi dan perkembangan embrio selanjutnya, sehingga diperlukan pengetahuan tentang kinetika maturasi inti oosit (Dominko dan Firts, 1997).

Proses pembelahan meiosis dan maturasi oosit dikontrol oleh enzim protein kinase dan fosfatase melalui fosforilasi dan defosforilasi, yang dikenal dengan *maturation promoting factor* (MPF) dan *mitogen activated protein kinase* (MAPK) (Whitaker, 1996). *Maturation promoting factor* berfungsi untuk mengontrol dimulainya kembali meiosis pada tahap *germinal vesikel* serta memelihara istirahat meiosis pada

oosit tahap MII (Tian *et al.*, 2002; Lord dan Aitken, 2013). Aktivitas MPF muncul sesaat sebelum tahap *germinal vesikel breakdown* (GVBD) kemudian meningkat pada tahap metafase I (MI) dan selanjutnya akan mengalami penurunan selama transisi dari tahap MI ke tahap MII dan kembali meningkat pada tahap MII (Gordon, 2003). *Maturation promoting factor* selama proses maturasi diperlukan untuk menstimulasi terjadinya *nuclear membran breakdown*, kondensasi kromosom, dan pembentukan *spindle* metafase yang merupakan faktor penting untuk mendukung keberhasilan fertilisasi dan perkembangan awal embrio (Hunter, 2000). Pada oosit tahap MII/sebelum aktivasi oosit, MPF diperlukan untuk menstimulasi pembentukan pronukleus betina yang normal setelah fertilisasi (Kikuchi *et al.*, 2000). Lebih lanjut Lee dan Campbell (2008) melaporkan aktivitas MPF menurun secara signifikan pada oosit tahap MII yang tidak segera difertilisasi dan oosit akan mengalami penuaan (*aging*) sehingga menurunkan kompetensi oosit untuk berkembang ke tahap blastosis (Maalouf *et al.*, 2009; Miao *et al.*, 2009). Oosit yang *aging* akan mengalami berbagai perubahan seperti perubahan dinamika ion kalsium (Ca^{2+}) intraseluler (Fissore *et al.*, 2002), disfungsi mitokondria (Wilding *et al.*, 2001; Fissore *et al.*, 2002), perubahan keluarnya kortikal granula dan peningkatan kejadian polispermia (Ducibella, 1996).

Kafein dilaporkan aman digunakan untuk meningkatkan dan memelihara aktivitas MPF serta mempertahankan bentuk *spindle* metafase sama dengan oosit yang tidak mengalami *aging* sehingga meningkatkan kompetensinya (Kikuchi *et al.*, 2002; Ono *et al.*, 2011). Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas suplementasi kafein pada media maturasi terhadap tingkat

fertilisasi secara *in vitro* setelah mengetahui kinetika maturasi inti oosit domba.

METODE PENELITIAN

Kinetika Maturasi Inti Oosit Domba.

Koleksi dan Maturasi Oosit. Ovarium diperoleh dari Rumah Potong Hewan (RPH) kambing/domba Kampung Cikanyong, Desa Citaringgul, Kecamatan Babakan Madang, Kabupaten Bogor. Ovarium kemudian dibawa ke laboratorium dalam NaCl 0,9% yang ditambahkan antibiotik 100 IU/mL *penicilin* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dan 0,1 mg/mL *streptomycin* (Sigma-Aldrich) pada suhu 35-37°C. Oosit dikoleksi dengan cara pencacahan ovarium (*slicing*) menggunakan *scalpel* di dalam cawan petri yang berisi *phosphate buffered saline* (PBS) ditambah 10% *fetal bovine serum* (FBS) (Sigma, USA), 100 IU/mL *penicilin* dan 0,1 mg/mL *streptomycin*. Oosit yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit dengan sel kumulus yang kompak dengan lebih dari tiga lapis serta sitoplasma yang homogen. Selanjutnya, oosit dicuci dalam media maturasi sebanyak dua kali dan dimaturasi. Media maturasi adalah *tissue culture medium* (TCM)-199 (Gibco, USA) yang disuplementasi dengan 10 IU/mL *pregnant mare serum gonadotrophine*/PMSG (Kyoritsu Seiyaku, Japan), 10 IU/mL *human chorionic gonadotropin*/hCG (Kyoritsu Seiyaku, Japan), 50 µg/mL gentamycin (Sigma, USA), dan 10% *fetal bovine serum*/FBS (Sigma, USA). Maturasi oosit dilakukan dalam *drop* masing-masing 100 µL media maturasi untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* (Sigma-Aldrich, Inc, M-8410) di dalam inkubator pada suhu 39°C dengan 5% CO₂ selama 16 (M-16), 20 (M-20), 24 (M-24), dan 28 (M-28) jam.

Evaluasi Tingkat Maturasi Oosit. Oosit yang telah dimaturasi dilepaskan sel-sel kumulusnya dengan bantuan enzim *hyaluronidase* 0,25% (Sigma, USA) dan dipipet berulang-ulang menggunakan pipet yang sesuai dengan ukuran oosit. Oosit difiksasi dalam larutan *ethanol absolute* dan asam asetat dengan perbandingan 3:1 selama 48-72 jam. Preparat kemudian diwarnai dengan 2% *aceto-orcein* selama lima menit, kemudian pewarna dibilas dengan 25% asam asetat. Pengamatan inti oosit dengan menggunakan mikroskop fase kontras (Olympus IX, Japan). Tingkat maturasi inti dinilai berdasarkan kronologis perubahan status inti oosit yang dikelompokkan menjadi

tahap *germinal vesicle* (GV), *germinal vesicle breakdown* (GVBD), metafase I (MI), anafase-telofase (AT), dan metafase II (MII). Keberhasilan maturasi oosit dinilai berdasarkan pada persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII.

Efektivitas Penambahan Kafein Terhadap Kemampuan Fertilisasi

Maturasi dan Fertilisasi Oosit. Oosit dimaturasi selama 24 jam (M-24) dan 28 jam (M-28) tanpa penambahan kafein dan digunakan sebagai kelompok kontrol, sedangkan untuk kelompok perlakuan, penambahan kafein diberikan empat jam sebelum akhir periode maturasi (M24-Kaf-4) untuk oosit yang dimaturasi selama 24 jam. Pada oosit yang dimaturasi selama 28 jam, penambahan kafein dilakukan pada empat (M28-Kaf-4) dan delapan jam sebelum akhir periode maturasi (M28-Kaf-8). Konsentrasi kafein (Sigma-Aldrich, Inc, C-0750) yang digunakan adalah 10 mM mengacu pada Lee dan Campbell (2008).

Pada akhir periode maturasi, oosit dari semua kelompok difertilisasi seperti metode yang dilakukan Yasmin *et al.* (2015). Semen beku *dithawing* dalam air dengan suhu 30-32°C selama 30 detik, kemudian dicuci dengan cara sentrifugasi dalam media fertilisasi pada kecepatan 630 g (1800 rpm) selama lima menit. Setelah sentrifugasi, supernatan dibuang kemudian pelet diencerkan dengan media fertilisasi hingga diperoleh konsentrasi akhir 5x10⁶ spermatozoa/mL. Fertilisasi oosit dilakukan pada *drop* spermatozoa sebanyak 100 µL untuk 10-15 oosit dan ditutup dengan *mineral oil* (Sigma, USA). Oosit diinkubasi selama 12-14 jam dalam inkubator CO₂ 5% suhu 39°C.

Evaluasi Tingkat Fertilisasi *in vitro*.

Oosit yang telah difertilisasi kemudian difiksasi dan diwarnai seperti pada penelitian sebelumnya pada kinetika maturasi inti oosit domba. Penentuan tingkat kemampuan fertilisasi *in vitro* dilakukan berdasarkan pada pembentukan dan jumlah pronukleus (PN). Total oosit yang terfertilisasi adalah oosit yang mempunyai dua atau lebih pronukleus. Fertilisasi normal ditandai dengan terbentuknya dua pronukleus (2 PN), sedangkan oosit yang mempunyai lebih dari 2PN dikategorikan sebagai polispermi.

Analisis Statistika

Data berupa tingkat maturasi dan tingkat fertilisasi disajikan dalam persentase simpangan

simpangan bakunya. Data diuji secara statistika menggunakan analisis sidik ragam pada taraf nyata 95%. Apabila terdapat perbedaan yang nyata antar perlakuan, maka dilanjutkan dengan uji Fisher *Protected Least Significant Difference* (PLSD). Data diolah menggunakan program *Statview*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keberhasilan maturasi oosit dinilai berdasarkan pada persentase oosit yang mampu mencapai tahap MII. Pada penelitian ini, 27,6% oosit ditemukan sudah mencapai tahap MII pada jam ke-16 (Tabel 1). Kemudian terjadi peningkatan jumlah secara signifikan pada jam ke-20 (44,8%) dan jam ke-24 (88,9%) ($P < 0,05$). Setelah jam ke-24 sampai jam ke-28 dari periode maturasi, tidak ada peningkatan jumlah oosit yang mencapai tahap MII ($P > 0,05$). Data tersebut mengindikasikan bahwa kinetika maturasi inti oosit memperlihatkan adanya ketidakseragaman waktu yang diperlukan oleh oosit domba untuk mencapai tahap MII secara *in vitro* seperti yang dilaporkan oleh Cognie *et al.*, (2003). Menurut Lee dan Campbell (2008) bahwa maturasi oosit secara *in vitro* adalah sebuah proses yang tidak seragam dan terdapat variasi individu oosit dalam mencapai tahap MII, seperti yang dilaporkan pada sapi (Sirard *et al.*, 1989) dan babi (Ye *et al.*, 2002). Ketidakseragaman tersebut juga mungkin disebabkan oleh adanya perbedaan dalam perkembangan dan pertumbuhan oosit yang dikoleksi dari ovarium dengan aktivitas *intraovarian* (Carolan *et al.*, 1994; Roca *et al.*, 1998; Gordon, 2003; Alm *et al.*, 2005). Lebih lanjut dijelaskan oleh Muttaqin *et al.* (2015) bahwa walaupun secara morfologi oosit yang diseleksi mempunyai keseragaman akan tetapi setelah dimaturasi

oosit tersebut mempunyai kualitas dan kemampuan perkembangan yang heterogen. Faktor lain yang juga mungkin menyebabkan ketidakseragaman tersebut adalah kondisi kultur (Loneragan *et al.*, 2003), penambahan hormon dan media kultur (Farag *et al.*, 2009). Akibat ketidakseragaman dalam pematangan inti tersebut menyebabkan sejumlah oosit mengalami pematangan terlebih dahulu dan apabila oosit tersebut tidak difertilisasi pada masa optimumnya maka oosit akan mengalami penuaan (*aging*).

Pada penelitian ini ditemukan tidak terjadi peningkatan persentase oosit yang mencapai tahap MII apabila periode maturasi oosit diperpanjang sampai 28 jam, mengindikasikan bahwa sebagian besar oosit domba sudah mengalami maturasi inti setelah 24 jam periode maturasi. Kikuchi *et al.* (2000) melaporkan bahwa walaupun tidak ada perubahan status inti dan morfologi oosit selama periode istirahat meiosis, akan tetapi terdapat perbedaan dalam kualitas oosit. Apabila periode istirahat meiosis diperpanjang akan menyebabkan perubahan pada sitoplasma oosit domba sehingga oosit mengalami degenerasi (Maximo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Lebih lanjut Lee dan Campbell (2008) menunjukkan bahwa walaupun aktivitas MPF pada oosit domba meningkat maksimum pada tahap MII tetapi kemudian menurun pada jam berikutnya apabila oosit tidak segera difertilisasi. Oleh karena itu oosit yang mencapai tahap MII lebih awal, aktivitas MPF mungkin menurun lebih awal sehingga akan menurunkan kompetensinya untuk berkembang lebih lanjut.

Ketidakeragaman oosit dalam mencapai tahap MII menyebabkan ketidakseragaman dalam kemampuan oosit untuk difertilisasi akibat penurunan aktivitas MPF pada oosit yang sudah mencapai tahap MII lebih awal (Kikuchi

Tabel 1. Tingkat pematangan inti oosit domba yang dimaturasi dengan interval waktu yang berbeda

Lama maturasi	Total oosit	% status inti oosit \pm SD (n)					
		GV	GVBD	MI	A/TI	MII	DEG
M-16	58	0,0 \pm 0,0 (0)	0,0 \pm 0,0 (0) ^a	44,8 \pm 9,1 (26) ^a	27,6 \pm 7,1 (16) ^a	27,6 \pm 3,3 (16) ^a	0,0 \pm 0,0 (0)
M-20	58	0,0 \pm 0,0 (0)	10,3 \pm 5,5 (6) ^b	41,4 \pm 4,8 (24) ^a	1,7 \pm 5,1 (1) ^b	44,8 \pm 6,0 (26) ^a	1,7 \pm 3,7 (1)
M-24	54	0,0 \pm 0,0 (0)	5,6 \pm 6,3 (3) ^{c,b}	3,7 \pm 5,5 (2) ^b	1,9 \pm 4,5 (1) ^b	88,9 \pm 7,2 (48) ^b	0,0 \pm 0,0 (0)
M-28	56	0,0 \pm 0,0 (0)	1,8 \pm 3,4 (1) ^{a,c}	7,1 \pm 9,9 (4) ^b	1,8 \pm 4,1 (1) ^b	89,3 \pm 10,3 (50) ^b	0,0 \pm 0,0 (0)

Keterangan: ^{a,b,c} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$); GV : *germinal vesicle*, GVBD : *germinal vesicle breakdown*, MI : metafase I, A/TI : anafase/telofase, MII : metaphase II.

et al., 2000; Lee dan Campbell, 2008; Miao *et al.*, 2009). Sementara itu Nagai *et al.* (2001) melaporkan bahwa ketidakseragaman maturasi inti dan maturasi sitoplasma dalam oosit akan meningkatkan kejadian polispermia. Pada penelitian ini juga ditemukan adanya peningkatan kejadian polispermi yang signifikan ($P < 0,05$) pada oosit yang dimaturasi selama 28 jam jika dibandingkan dengan kelompok 24 jam (Tabel 2). Peningkatan kejadian polispermi pada oosit *aging* kemungkinan juga diakibatkan karena terjadi perubahan pada sitoplasma oosit seperti menurunnya osilasi Ca^{2+} sehingga menyebabkan berkurangnya kepadatan kortikal granula pada oosit (Ducibella, 1996; Wang *et al.*, 2003) sehingga polispermi dapat terjadi pada oosit yang dimaturasi dengan periode waktu yang lebih lama.

Efektivitas penambahan kafein pada penelitian ini dievaluasi berdasarkan kemampuan oosit untuk difertilisasi oleh spermatozoa. Tidak ditemukan adanya perbedaan yang signifikan ($P > 0,05$) pada tingkat fertilisasi total antar perlakuan kecuali pada penambahan kafein delapan jam sebelum akhir periode maturasi (M28-Kaf-8) (Tabel 2). Penambahan kafein selama delapan jam sebelum akhir periode maturasi pada penelitian ini memperlihatkan tingkat fertilisasi yang lebih rendah daripada kelompok lainnya. Hal ini kemungkinan disebabkan karena pemaparan oosit yang terlalu lama dalam kafein sehingga mengganggu filamen sitoskeleton dalam oosit seperti yang dilaporkan oleh Mannomani *et al.* (2004) dan Fathi *et al.* (2014). Penambahan kafein selama empat jam akhir periode maturasi baik pada oosit yang dimaturasi selama 24 jam (M24-Kaf-4) atau 28 jam (M28-Kaf-4) dapat

memperbaiki tingkat fertilisasi normal (2PN) dan menurunkan tingkat polispermi bila dibandingkan dengan kelompok oosit yang dimaturasi selama 28 jam (M-28) tanpa penambahan kafein ($P < 0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa kafein diduga dapat mempertahankan atau meningkatkan aktivitas MPF pada oosit yang mencapai tahap MII lebih awal (*aging*). Data pada penelitian sejalan dengan hasil penelitian terdahulu yang dilaporkan oleh Lee dan Campbell, (2008). Dipeliharanya aktivitas MPF pada oosit tahap MII dengan menggunakan kafein dapat memperpanjang waktu optimal fertilisasi (Maalouf *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 2011). Kafein dapat meningkatkan aktivitas MPF pada oosit melalui penghambatan aktivitas *Wee1* dan *Myt1* kinase, yang merupakan protein kinase pengatur tinggi dan rendahnya aktivitas MPF. Mekanisme penghambatan aktivitas *Wee1* dan *Myt1* kinase tersebut akan menginduksi terjadinya defosforilasi dari *tyrosine-15* (Y-15) dan *threonine-14* (T-14) dari $p34^{cdc2}$, sehingga terjadi perubahan dari pre-MPF menjadi MPF aktif, yang mengakibatkan tingginya aktivitas MPF (Kikuchi *et al.*, 1999; Kikuchi *et al.*, 2000; Miao *et al.*, 2009). Lebih lanjut Zhang *et al.* (2011) melaporkan bahwa kafein dapat memelihara dan mencegah hilangnya sensitivitas *inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type-1* (IP3R1) dan penurunan osilasi Ca^{2+} di retikulum endoplasma (RE) selain itu, kafein memelihara aktivitas mitokondria oosit sehingga dapat menghasilkan ATP untuk menjaga homeostasis Ca^{2+} . Menurut Lee dan Campbell, (2008) bahwa pada transfer inti, oosit domba yang diberikan kafein dapat mengakibatkan peningkatan aktivitas *nuclear envelope*

Tabel 2. Tingkat fertilisasi oosit domba setelah dimaturasi dengan atau tanpa kafein

Perlakuan	Total Oosit	% Pembentukan pronukleus (PN)±SD (n)		Total Terfertilisasi
		2 PN	>2PN	
M24	60	73,3 ± 3,1 (44) ^a	16,7 ± 6,4 (10) ^a	90,0 ± 7,1 (54) ^a
M28	56	53,6 ± 4,9 (30) ^b	28,6 ± 7,0 (16) ^b	82,1 ± 5,3 (46) ^{a,b}
M24-Kaf-4	52	80,8 ± 6,19 (42) ^c	11,5 ± 7,3 (6) ^{a,c}	92,3 ± 6,1 (48) ^a
M28-kaf-8	53	52,8 ± 5,1 (28) ^{b,d}	24,5 ± 4,8 (13) ^{a,b}	77,4 ± 5,9 (41) ^b
M28-Kaf-4	50	78,0 ± 3,2 (39) ^{a,c}	16,0 ± 6,2 (8) ^{a,c}	94,0 ± 6,2 (47) ^a

Keterangan: ^{a, b, c, d} Superskrip yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang nyata ($P < 0,05$); 2PN: dua pronukleus, >2PN: polispermi, lebih dari dua pronukleus, total terfertilisasi: jumlah oosit yang dapat membentuk 2PN atau >2PN dari keseluruhan jumlah oosit yang difertilisasi.

breakdown (NEBD) dan peningkatan yang signifikan pada jumlah sel embrio tahap blastosis.

Penurunan persentase polispermi pada kelompok oosit yang dimaturasi dengan kafein selama empat jam diduga karena kafein dapat memelihara aktivitas MPF, sehingga dapat mengatur kembali RE dan meningkatkan dinamika Ca²⁺ pada oosit sehingga pada saat fertilisasi pelepasan Ca²⁺ intraseluler dari RE dapat memediasi blok polispermi (Stricker dan Smythe, 2003; Zhang *et al.*, 2011; McAvey *et al.*, 2002; Fathi *et al.*, 2014). Penambahan kafein pada medium oosit mencit yang mengalami *aging* telah berhasil mendapatkan anak yang sehat dengan metode *intracytoplasmic sperm injection* (ICSI) (Ono *et al.*, 2011). Hasil penelitian lain pada unta melaporkan bahwa penambahan kafein pada enam jam akhir periode maturasi dapat meningkatkan persentase maturasi inti, tingkat fertilisasi, dan perkembangan preimplantasi (Fathi *et al.*, 2014).

SIMPULAN

Kinetika maturasi inti oosit domba menunjukkan ketidakseragaman waktu yang dibutuhkan oleh oosit untuk mencapai tahap MII dan kafein dapat meningkatkan fertilisasi normal dan menurunkan frekuensi polispermi pada oosit ketika periode maturasi diperpanjang.

SARAN

Diperlukan studi lebih lanjut untuk melihat perubahan aktivitas MPF dan perkembangan embrio lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Studi dan penelitian ini dibiayai dari beasiswa Kemristek Dikti melalui program Beasiswa Pendidikan Pascasarjana dalam Negeri tahun 2013-2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Alm H, Torner H, Lohrke B, Viequtz T, Ghoneim IM, Kanitz W. 2005. Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose 6 phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63(8): 2194-2205.
- Blanco MR, Demydas S, Morenno MM, Genero E. 2011. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotech and Mol Bio* 6(7): 156-165.
- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I. 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. *Theriogenology* 41: 1061-1068.
- Cognie Y, Baris G, Poulin N, Mermillod, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59: 171-188.
- Dominko T, First NL. 1997. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 47: 456-467.
- Ducibella T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Hum Reprod Update* 2: 29-42.
- Farag M, Girgis SM, Khalil WKB, Hassan NHA, Sakr AAM, Abd Allah SM, Ali NI. 2009. Effect of hormones, culture media and oocyte quality on in vitro maturation of Egyptian Sheep oocytes. *J Appl Biosci* 24: 1520-1534.
- Fathi M, Adel A, Sobhy R, Darwish G, Badr M, Moawad A. 2014. Caffeine supplementation during IVM improves frequencies of nuclear maturation and preimplantation development of dromedary camel oocytes following IVF. *Theriogenology* 81(9): 1286-1292.
- Fissore RA, Kurokawa M, Knott J, Zhang M, Smyth J. 2002. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. *Reproduction* 124: 745-754.
- Gordon I. 2003. *Laboratory of Cattle Production*: 2nd Ed. London (GB): CABI Publishing. Hlm. 2; 24.
- Hegab AO, Montasser AE, Hamman AM, Abu El-Naga EMA, Zaabel SM. 2009. Improving in vitro maturation and cleavage rates of buffalo oocytes. *Anim Reprod Sci* 108: 122-133.
- Hunter MG. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* 5:

- 122-130.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Kaneko H, Tojo H. 2002. Maturation/M-phase promoting factor regulates aging of porcine matured in vitro. *Cloning and Stem Cells* 4(3): 211-222.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Aoki F, Tojo H, Toyoda Y. 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol Reprod* 63: 715-722.
- Kikuchi K, Naito K, Noguchi J, Shimada A, Kaneko H, Yamashita M, Tojo H, Toyoda Y. 1999. Inactivation of p34^{cdc2} kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged in vitro. *Zygote* 7: 173-179.
- Lee J, Campbell K. 2008. Caffeine treatment prevents age-related changes in ovine oocytes and increases cell numbers in blastocysts produced by somatic cell nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells* 10(3): 381-390.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim* 38: 259-267.
- Lord T, Aitken RJ. 2013. Oxidative stress and aging of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction* 146: 217-227.
- Maalouf WE, Lee JH, Campbell KHS. 2009. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryos development on in vitro matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology* 71: 1083-1092.
- Manonmani P, Okada H, Ogonuki N, Uda A, Ogura A, Yoshida T, Sankai T. 2004. Fertilization and preimplantation development of mouse oocytes after prolonged incubation with caffeine. *Reprod Med Biol* 3: 245-251.
- Máximo D, Martins da Silva, Mondadori B, Nevesd JP, Luccib CM. 2012. Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during in vitro maturation (IVM). *Small Rumin Res* 105: 210-215.
- McAvey BA, Wortzman GB, Williams GJ, Evans JP. 2002. Involvement of calcium signalling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol Reprod* 67: 1342-1352.
- Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Heide S. 2009. Aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 1(1): 1-13.
- Muttaqin Z, Karja NWK, Setiadi MA. 2015. Kemampuan maturasi dan fertilisasi oosit sapi yang diseleksi menggunakan teknik pewarnaan Brilliant Cresyl Blue. *J Veteriner* 16(2): 242-248.
- Nagai T, Yamaguchi N, Kikuchi K. 2002. Nuclear and cytoplasmic maturation in vitro of porcine oocytes. *J Reprod Dev* 47: 55-61.
- Nagano M, Uchikura K, Takahashi Y, Hishinuma M. 2008. Effect of duration of in vitro maturation on nuclear maturation and fertilizability of feline oocytes. *Theriogenology* 69: 231-236.
- Ono T, Mizutani E, Li C, Yamagata K, Wakayama T. 2011. Offspring from intracytoplasmic sperm injection of aged mouse oocytes treated with caffeine or MG132. *Genesis* 49: 460-471.
- Rahman ANMA, Abdullah RB, Wan Khadijah WE. 2008. In vitro maturation of oocytes with special reference to goat: A review. *Biotechnology* 7(4): 599-611.
- Roca J, Martinez E, Vazquez JM, Lucas X. 1998. Selection of immature pig oocytes for homologous in vitro penetration assays with the brilliant cresyl blue test. *Reprod Fertil Dev* 10: 479-485.
- Setiadi MA, Karja NWK. 2013. Tingkat perkembangan awal embrio sapi in vitro menggunakan media tunggal berbahan dasar tissue culture medium (TCM) 199. *Jurnal Kedokteran Hewan* 7(2): 150-153.
- Sirard MA, Florman HM, Leibfried-Rutledge ML, Barnes FL, Sims ML, First NL. 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol Reprod* 40: 1257-1263.
- Sirard MA. 2011. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J Assist Reprod Genet* 28: 483-488.

- Somfai TS, Kikuchi K, Onishi A, Iwamoto M, Fuchimoto D, Papp AGB, Sato E, Nagai T. 2004. Relationship between the morphological changes of somatic compartment and the kinetics of nuclear and cytoplasmic maturation of oocytes during in vitro maturation of porcine follicular oocytes. *Mol Reprod Dev* 68: 484-491.
- Sreenivas D, Kaladhar DSVGK, Yarla NS, Thomas VM, Palnisamy A, Vadiapudi VR, Preethi R. 2014. In vitro production of sheep embryos in CR1aa medium supplemented with L-Ascorbic acid. *J Tissue Sci Eng* 5: 131.
- Stricker SA, Smythe TL. 2003. Endoplasmic reticulum reorganizations and Ca^{2+} signaling in maturing and fertilized oocytes of marine protostome worms: the roles of MAPKs and MPF. *Development* 130: 2867-2879.
- Suzukamo C, Hoshina M, Moriya H, Hishiyama, N, Nakamura S, Fumie K, Sato H, Ariga M, Ito J, Kashiwazaki N. 2009. Kinetic of nuclear status and kinase activities during in vitro maturation of canine oocytes. *J Reprod Dev* 55: 116-120.
- Tian XC, Lonergan P, Jeong BS, Evans AC, Yang X. 2002. Association of MPF, MAPK, and nuclear progression dynamics during activation of young and aged bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 62: 132-138.
- Wang WH, Billy ND, Wu GM. 2003. How does polyspermy happen in mammalian oocytes?. *Microscopy Research and Technique* 61: 335-341.
- Wani NA, Nowshari MA. 2005. Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on in vitro maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology* 64: 75-85.
- Whitaker M. 1996. Control of meiotic arrest. *Rev Reprod* 1: 127-135
- Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G. 2001. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 16: 909-917.
- Yasmin C, Otoi T, Setiadi MA, Karja NWK. 2015. Maturation and fertilisation of sheep oocytes cultured in serum-free medium containing silk protein sericin. *Acta Veterinaria Hungarica* 63(1): 110-117.
- Ye J, Flint AP, Campbell, KH, Luck MR. 2002. Synchronization of porcine oocytes meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells. *Reprod Fertil Dev* 14: 433-442.
- Zhang GM, Gu CH, Zhang YL, Sun HY, Qian WP, Zhou ZR, Wan YJ, Jia RX, Wang LZ, Wang F. 2013. Age-associated changes in gene expression of goat oocytes. *Theriogenology* 80: 328-336.
- Zhang N, Wakai T, Fissore RA. 2011. Caffeine alleviates the deterioration of Ca^{2+} release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 78: 648-701.