

TESIS

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL
DAUN KELOR (*Moringa pterygosperma* Gaertn) TERHADAP
TINGKAT KEMATANGAN OOSIT PADA MEDIUM
MATURASI OOSIT KAMBING SECARA *IN VITRO***



KKA
KC
TKR 30/19
SYA
S

**NUR ANINDYA SYAMSUDI
NIM. 011724653016**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

TESIS



**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL
DAUN KELOR (*Moringa pterygosperma* Gaertn) TERHADAP
TINGKAT KEMATANGAN OOSIT PADA MEDIUM
MATURASI OOSIT KAMBING SECARA *IN VITRO***

**NUR ANINDYA SYAMSUDI
NIM. 011724653016**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL
DAUN KELOR (*Moringa pterygosperma* Gaertn) TERHADAP
TINGKAT KEMATANGAN OOSIT PADA MEDIUM
MATURASI OOSIT KAMBING SECARA *IN VITRO***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister Kesehatan
Dalam Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi
Pada Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Oleh :

**NUR ANINDYA SYAMSUDI
011724653016**

**PROGRAM STUDI ILMU KESEHATAN REPRODUKSI
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2019**

iii



LEMBAR PENETAPAN PANITIA PENGUJI

Tesis ini telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada
Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Pada tanggal, 19 November 2019

Panitia Penguji,

Ketua : Prof. Dr. Paulus Liben, dr., MS
Anggota : 1. Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si
2. Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG(K)
3. Prof. Dr. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D
4. Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Tesis

v



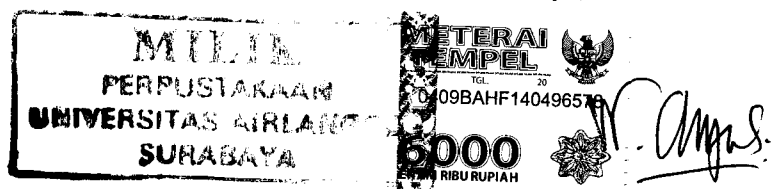
PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

Suplementasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap Tingkat Kematangan Oosit pada Medium Maturasi Oosit Kambing secara *In Vitro*

Tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 19 November 2019



Nur Anindya Syamsudi
NIM. 011724653016

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga usulan penelitian tesis dengan judul **“Suplementasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa pterygosperma Gaertn*) terhadap Tingkat Kematangan Oosit pada Medium Maturasi Oosit Kambing secara *In Vitro*”** dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Prof. Dr. Widjiati, drh., M.Si., selaku Pembimbing I yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis ucapkan kepada Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp. OG(K), selaku Pembimbing II yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran yang berharga dalam penyusunan usulan penelitian tesis ini.

Terimakasih juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Paulus Liben, dr., MS, Prof. Dr. Sri Agus Sudjarwo, drh., Ph.D, dan Dr. Sulistiawati, dr., M.Kes yang telah memberikan bimbingan, masukan, dan arahan untuk penelitian ini.

Dengan terselesainya usulan penelitian tesis ini, perkenankan penulis untuk mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Moh. Nasih, SE., MT., Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan pendidikan.
2. Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp. U., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Magister.
3. Dr. Hermanto Tri Joewono, dr., Sp. OG(K), selaku Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister yang telah memberikan kesempatan untuk menempuh pendidikan pada Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
4. Semua dosen dan staf di Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah memberikan

ilmu, motivasi, bimbingan, serta arahan kepada penulis selama mengikuti pendidikan.

5. Semua Staf dan Asisten Dosen Laboratorium Embriologi dan *In Vitro* Fakultas Kedokteran Hewan memberikan bantuan atas terlaksananya penelitian sampai selesainya penyusunan tesis.
6. Kedua orang tua dan adik tercinta, Ayah Gandhi Syamsudi, M.Pd, Ibu Lilik Nadhiroh, SE, dan Adik Faizatuz Azzahrah Syamsudi yang telah menemani setiap waktu dan memberikan dukungan moril serta materi serta senantiasa memberikan doa tanpa henti selama proses sampai selesainya penyusunan tesis.
7. Keluarga besar Bani Rochmad dan Bani Tamanu, yang telah memberikan dukungan moril dan senantiasa memberikan doa tanpa henti selama proses sampai selesainya penyusunan tesis.
8. Sahabat tersayang, Tinta Julianawati, Eka Agustina Wulandari, Nafisatuzzamrudah, Rahma Anugraheny, dan Ceria Puspita Rini yang senantiasa menemani disaat titik terendah dan memberikan dukungan, motivasi, masukan, dan bimbingan dalam proses penyusunan tesis.
9. Teman-teman IKR UNAIR angkatan 2017 yang saling memberikan semangat, bantuan, doa dan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan dan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna, sehingga diharapkan masukan yang membangun demi kesempurnaan tesis ini. Saya berharap semoga penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca, masyarakat dan Program Studi Ilmu Kesehatan Reproduksi.

Surabaya, November 2019

Penulis

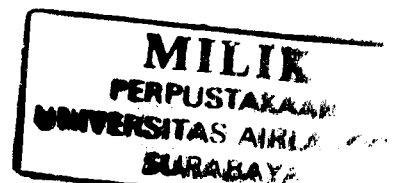
RINGKASAN

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR
(*Moringa pterygosperma* Gaertn) TERHADAP TINGKAT KEMATANGAN
OOSIT PADA MEDIUM MATURASI OOSIT KAMBING
SECARA *IN VITRO***

Nur Anindya Syamsudi

In vitro maturation (IVM) merupakan proses kompleks yang dipengaruhi oleh interaksi berbagai faktor-faktor regulasi yang mencakup keadaan biokimiawi oosit, interaksi sel oosit dengan kumulus (Khazaei *et al.*, 2017). Maturasi *in vitro* dilakukan agar oosit primer mampu menyelesaikan proses meiosis sehingga menjadi oosit sekunder yang haploid, mampu dibuahi oleh spermatozoa, dan mampu mendukung perkembangan embrio selanjutnya (Hamny *et al.*, 2017). Keberhasilan fertilisasi *in vitro* sebanyak 70,7% dan keberhasilan kehamilan sebanyak 33,1% didapatkan pada oosit dengan maturasi metaphase II (Alvarez *et al.*, 2013). Selain itu, kompetensi perkembangan embrio ditentukan oleh pematangan sitoplasma dan inti oosit (Coello *et al.*, 2018). Tahap profase pembelahan meiosis pertama dalam maturasi oosit sangat rentan terhadap berbagai kontaminasi berbahaya (Wang *et al.*, 2017). Oosit primer juga lebih sensitif terhadap lingkungan (Schatten *et al.*, 2007), peningkatan radikal bebas (Barakat *et al.*, 2018), dan stres oksidatif (Sadeesh *et al.*, 2014). Kondisi medium maturasi *in vivo* tidak dapat ditiru sepenuhnya dalam situasi *in vitro*. *Reactive oxygen species* (ROS) dihasilkan pada berbagai tingkat yang bergantung komposisi yaitu proses metabolisme sel normal, bahan kimia yang ditambahkan ke medium, paparan cahaya, hiperoksida, tekanan gas CO₂, dan suhu (Barakat *et al.*, 2018). Kondisi dan komposisi medium maturasi memicu produksi ROS. Peningkatan suhu yang menimbulkan *Heat shock* (HS) memicu radikal bebas sehingga dapat menghambat metafase I dan metafase II dalam proses pembelahan meiosis, meskipun HS tidak mempengaruhi proses *germinal vesicle breakdown* (GVBD) selama oogenesis (Naseer *et al.*, 2017). Kultur oosit secara *in vitro* dalam kondisi kadar oksigen lebih tinggi daripada *in vivo*, sehingga mengarah ke peningkatan ROS yang menyebabkan peroksidasi lipid dari membran sel (Sadeesh *et al.*, 2014).

Manipulasi media kultur *in vitro* dibutuhkan untuk meminimalkan stres oksidatif (Naseer *et al.*, 2017), dan meningkatkan kemampuan maturasi oosit (Barakat *et al.*, 2018). Berbagai jenis antioksidan alami telah ditambahkan sebagai suplemen untuk medium *in vitro* mamalia. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber antioksidan alami, yaitu daun kelor. Penelitian yang dilakukan oleh Sreelatha dan Padma (2009) menunjukkan bahwa kandungan polifenol yang bertindak sebagai antioksidan yaitu fenolik (45,81 mg/g) dan flavonoid (27mg/gr) sehingga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Flavonoid merupakan metabolit sekunder pada struktur polifenol yang memiliki efek biokimia, farmasi dan antioksidan (Panche *et al.*, 2016). Potensi flavonoid terbatas karena mudah teroksidasi (Anwar *et al.*, 2019) kapasitas absorpsi rendah, ukuran molekul yang besar (Patra *et al.*, 2018), namun potensinya sangat baik untuk antioksidan tinggi sehingga formulasi karakteristik zat aktif diperlukan untuk mempertahankan manfaat senyawa (Duta *et al.*, 2019).



Sistem pengiriman obat pada bahan berukuran besar mengakibatkan ketidakstabilan *in vivo*, bioavailabilitas rendah, solubilitas rendah, absorpsi rendah, kapasitas difusi ke membran yang rendah dan permasalahan pada pengiriman target spesifik (Patra *et al.*, 2018). Biomaterial sebagai pengembangan sistem pengiriman obat berbasis nanoteknologi dapat memenuhi serangkaian karakteristik, seperti stabilitas yang baik, biokompatibilitas dan biodegradabilitas, pemuatan obat yang tinggi, sifat mekanik yang baik, pelepasan terkontrol atau berkelanjutan, perlindungan obat (Garcia *et al.*, 2017), adanya modifikasi kimia, dan struktur unik sebagai potensial *nanomedicine* (Patra *et al.*, 2018).

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dapat meningkatkan tingkat kematangan oosit dengan dosis 10, 20, dan 30 mg/ml pada medium maturasi oosit kambing secara *in vitro*.

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment* dengan rancangan *post test only control group design*. Formulasi sistem nanopartikel menggunakan metode *top down* dengan zat aktif flavonoid daun kelor. Oosit dikumpulkan dari ovarium kambing rumah pemotongan hewan lokal dengan cara aspirasi dan dimaturasi selama 24 jam dalam medium maturasi yang berbeda. Penelitian ini terdiri dari kelompok kontrol (K1): G-MOPS PLUS (1 mL) + PG 600 (10 IU/mL), kelompok 2 (K2): Medium kontrol + Nanopartikel daun kelor (250 µg), kelompok 3 (K3): Medium kontrol + Nanopartikel daun kelor (500 µg), dan kelompok 4 (K4): Medium kontrol + Nanopartikel daun kelor (750 µg). Evaluasi tingkat kematangan oosit dengan metode pewarnaan aceto-orcein 2% dan pengamatan menggunakan mikroskop fase kontras perbesaran 40x.

Data dianalisis dengan uji *one way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat pengaruh berbagai variasi dosis suplementasi nanopartikel daun kelor terhadap tingkat kematangan oosit tahap metaphase II (MII) dengan nilai signifikansi ($p=0,005$). Efek variasi dosis 250, 500, 750 dan 0 (kontrol) µg suplementasi nanopartikel daun kelor terhadap presentase tingkat kematangan oosit (MII) adalah $41,45\% \pm 4,34$, $48,37\% \pm 1,55$, $33,97\% \pm 0,33$, dan $32,47\% \pm 1,25$. Hal ini menunjukkan presentase tingkat kematangan oosit tahap MII lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hasil uji *Pos Hoc LSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pengaruh presentase suplementasi nanopartikel daun kelor terhadap tingkat kematangan oosit tahap metaphase II (MII) antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 250 µg ($p=0,029$) dan dosis 500 µg ($p=0,002$). Namun, tidak terdapat perbedaan pengaruh antara kelompok kontrol dan kelompok dosis 750 µg ($p=0,669$). Hal ini menunjukkan bahwa efek dosis suplementasi nanopartikel daun kelor dalam meningkatkan presentase tingkat kematangan oosit tahap MII hanya terbukti sampai 500 µg.

Kesimpulan penelitian ini adalah suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dapat meningkatkan tingkat kematangan oosit dengan dosis 250, 500, dan 750 µg pada medium maturasi oosit kambing secara *in vitro*.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu melakukan penelitian mengenai suplementasi nanopartikel daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dalam bentuk isolat untuk mengevaluasi tingkat kematangan oosit dan variasi dosis sama terhadap kejadian apoptosis pada maturasi oosit.

SUMMARY

**SUPPLEMENTATION OF ETHANOL EXTRACT NANOPARTICLE
FROM DRUMSTICK LEAVES (*Moringa pterygosperma* Gaertn)
IMPROVES GOAT OOCYTE MATURITY LEVEL
IN MATURATION MEDIUM IN VITRO**

Nur Anindya Syamsudi

In vitro maturation (IVM) is a complex process influenced by interaction of various factors that regulate biochemistry in oocytes and by interaction of oocyte cells with cumulus. (Khazaei et al., 2017). Maturation of oocytes in vitro is done to enable primary oocytes to complete the process of meiosis to form haploid secondary oocytes, which is the final form that would be able to be fertilized by spermatozoa, and able to support subsequent embryonic development (Hamny et al., 2017). The success of in vitro fertilization as much as 70.7% and pregnancy success as much as 33.1% were obtained in oocytes with metaphase II maturation (Alvarez et al., 2013). The first prophase of meiosis division in oocyte maturation is very susceptible to various dangerous contaminations, such as drugs and chemical pollutants (Wang et al., 2017). In addition, primary oocytes are also more sensitive to the environment (Schatten et al., 2007), to the increase of free radicals (Barakat et al., 2018), and to the increase of oxidative stress (Sadeesh et al., 2014). The condition of in vivo maturation medium cannot be fully imitated in the in vitro medium. Reactive oxygen species (ROS) are produced at various levels depending on the composition, namely the process of normal cell metabolism, chemicals added to the medium, exposure to light, hyperoxide, CO₂ gas pressure, and temperature (Barakat et al., 2018). The condition and composition of the maturation medium triggers the production of ROS. Increased temperature that cause heat shock (HS) to produce free radicals can inhibit metaphase I and metaphase II in the process of meiosis division, although HS does not affect the process of germinal vesicle breakdown (GVBD) during oogenesis (Naseer et al., 2017). In vitro oocyte cultures produce higher oxygen concentrations than in vivo environment does, which leads to an increase of reactive oxygen species (ROS) level that cause lipid peroxidation of cell membranes (Sadeesh et al., 2014).

Manipulation of in vitro culture media is needed to minimize the oxidative stress (Naseer et al., 2017) and to increase the maturation ability of oocyte (Barakat I, et al., 2018). Various types of natural antioxidants have been added as supplements for mammalian in vitro media. One of the plants that can be used as a source of natural antioxidants is drumstick leaves. Research conducted by Sreelatha and Padma (2009) showed that drumstick leaves have polyphenols contents which act as antioxidant, such as phenolic (45.81 mg/g) and flavonoid (27mg/gr), thus showing high antioxidant activity. Flavonoids are secondary metabolites in the structure of polyphenols that have biochemical, pharmaceutical, and antioxidant effects (Panche et al., 2016). Potency of flavonoids is limited due to their pH intolerance, their easily oxidized profile, and their very low water solubility (Anwar et al., 2019). Despite all those limitations, the potency of these leaves is very good as antioxidant, so the characteristic formulation of active



substances is needed to maintain the benefits of the compounds contained in the leaves (Duta et al., 2019).

Drug delivery systems in large-sized materials cause instability *in vivo*, low bioavailability, low solubility, low absorption, low diffusion capacity to the membrane and problems in the delivery of specific targets (Patra et al., 2018). Biomaterials as the development of nanotechnology-based drug delivery systems can meet a range of characteristics, such as good stability, biocompatibility and biodegradability, high drug loading, good mechanical properties, controlled or continuous release, drug protection (Garcia et al., 2017), modifications chemistry, and unique structure as nanomedicine potential (Patra et al., 2018).

The aim of this study was to analyze the effect of supplementation of ethanol extract nanoparticles from *Moringa pterygosperma* Gaertn at doses of 10, 20, and 30 mg/ml in maturation medium *in vitro* on the level of goat oocyte maturity.

This study was a true experimental research with a post-test only control group design. The nanoparticle system formulation used the top down method with Moringa leaf flavonoid active substances. Oocytes were collected from the ovaries of the local goat from slaughterhouse by aspiration and matured for 24 hours in different mediums of maturation. This study consisted of a Control Group (K1): G-MOPS PLUS (1 mL) + PG 600 (10 IU mL), Group 2 (K2): control maturation medium + Moringa leaf nanoparticles (250 µg), Group 3 (K3): control maturation medium + Moringa leaf nanoparticles (500 µg), and Group 4 (K4): control maturation medium + Moringa leaf nanoparticles (750 µg). The level of oocyte maturity is evaluated using the 2% aceto-orcein staining method and observed using a phase contrast microscope with a magnification of 40x.

Data analyzed by one way ANOVA test showed that there was an effect of various variations in the dose of supplementation on the level of oocyte maturation stage of metaphase II with a significance value ($p = 0.005$). The effect of dose variations of 250, 500, 750 and 0 (control) µg of supplementation on the percentage of oocyte maturity level (MII) was $41.45\% \pm 4.34$, $48.37\% \pm 1.55$, $33.97\% \pm 0.33$, and $32.47\% \pm 1.25$. This showed the percentage level of MII oocyte maturity is higher than the control group. The results of the Post Hoc LSD test showed that there was a difference in the influence of the percentage of supplementation on the level of oocyte maturity of metaphase II stage between the control group and the 250 µg dose group ($p = 0.029$) and 500 µg dose ($p = 0.002$). However, there was no difference in effect between the control group and the 750 µg dose group ($p = 0.669$). This shows that the effect of doses of Moringa leaf nanoparticles supplementation in increasing the percentage of MII stage oocyte maturity level is only proven to be up to 500 µg.

It could be concluded from this study that the supplementation of ethanol extract nanoparticle from *Moringa pterygosperm* Gaertn leaves with a dose of 250, 500, and 750 µg maturation medium *in vitro* could increase the level of goat oocyte maturity.

Suggestions for further research need to conduct research on the supplementation of *Moringa pterygosperm* Gaertn leaves in the form of isolates to evaluate the degree of oocyte maturity and the same dose variation to the incidence of apoptosis in oocyte maturation.

ABSTRAK

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR
(*Moringa pterygosperma* Gaertn) TERHADAP TINGKAT KEMATANGAN
OOSIT PADA MEDIUM MATURASI OOSIT KAMBING
SECARA *IN VITRO***

Nur Anindya Syamsudi, Widjiati, Hendy Hendarto

Latar belakang: Kondisi medium maturasi *in vitro* memicu produksi radikal bebas sehingga mempengaruhi metabolisme dan perkembangan oosit. Daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) mengandung polifenol sebagai sumber antioksidan eksogen. Flavonoid merupakan metabolit sekunder struktur polifenol yang memiliki efek biokimia, farmasi dan antioksidan. Potensi flavonoid terbatas karena mudah teroksidasi, kapasitas absorpsi rendah, ukuran molekul yang besar. Formulasi nanopartikel daun kelor dengan zat aktif flavonoid diperlukan untuk meningkatkan stabilitas zat aktif dari degradasi lingkungan, seperti penguraian enzimatis, oksidasi dan hidrolisis, serta memperbaiki absorpsi suatu senyawa zat aktif.

Tujuan: Menganalisis pengaruh suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dengan dosis 250, 500, dan 750 µg dalam medium maturasi oosit kambing secara *in vitro* dapat meningkatkan tingkat kematangan oosit.

Bahan dan cara: Formulasi nanopartikel menggunakan metode *top down* dengan zat aktif flavonoid daun kelor. Oosit dikumpulkan dari ovarium kambing rumah pemotongan hewan lokal dengan cara aspirasi dan dimaturasi selama 24 jam dalam medium maturasi yang berbeda. Penelitian ini terdiri dari 4 kelompok 250, 500, 750 dan 0 (kontrol) µg suplementasi nanopartikel.

Hasil: Terdapat pengaruh berbagai variasi dosis suplementasi nanopartikel daun kelor terhadap tingkat kematangan oosit tahap metaphase II (MII) dengan nilai signifikansi ($p=0,005$). Terdapat perbedaan pengaruh presentase tingkat kematangan oosit tahap metaphase II (MII) antara kelompok kontrol dengan kelompok dosis 250 µg ($p=0,029$) dan dosis 500 µg ($p=0,002$).

Kesimpulan: Suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dalam medium maturasi oosit kambing secara *in vitro* dapat meningkatkan tingkat kematangan inti oosit.

Kata kunci : nanopartikel daun kelor, oosit, *reactive oxygen species*, *in vitro* maturation, tingkat kematangan inti oosit

