

ABSTRAK

SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) PADA OOSIT DAN SPERMATOZOA KAMBING TERHADAP ANGKA FERTILISASI SECARA *IN VITRO*

Tinta Julianawati, Hendy Hendarto, Widjiati

Latar Belakang : Pada saat ini fertilisasi *in vitro* telah dipercaya sebagai terapi definitif untuk infertilitas. Masalah yang sering terjadi pada proses *in vitro fertilization* (IVF) adalah adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan dari faktor eksogen. Salah satu cara untuk mengatasi hal tersebut dengan memberikan tambahan antioksidan. Nanoteknologi antioksidan dalam aplikasi biomedik memiliki manfaat yaitu penghantar obat terbaik dan dapat memaksimalkan *glutathione* (GSH). *Moringa pterygosperma* Gaertn. mengandung senyawa flavonoid. Flavonoid secara *in vitro* terbukti dapat menangkap senyawa ROS, menghambat kerusakan protein, kerusakan membran lipid.

Tujuan : Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui angka fertilisasi oosit kambing dengan suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor pada medium fertilisasi *in vitro*.

Bahan dan cara : Subyek penelitian ini menggunakan oosit kambing yang dibagi dalam 4 kelompok terdiri atas 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari minimal 59 oosit. Pada proses fertilisasi *in vitro*, Medium yang digunakan pada cawan petri adalah G-IVF sebanyak 6 μ L per drop dan penambahan nanopartikel ekstrak daun kelor dengan berbagai dosis yaitu 50 μ g, 100 μ g, 150 μ g sebanyak 5 μ L dibawah OVOIL-TM 100 sebanyak 2cc. Oosit dan spermatozoa diinkubasi di dalam inkubator 5% CO₂, kelembapan 95% dan suhu 38°C selama 22 jam.

Hasil : Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah oosit yang terfertilisasi secara signifikan pada perlakuan 100 μ g (31.9 \pm 2.2%) dibandingkan dengan 50 μ g, 150 μ g dan kelompok kontrol sebesar (20.6 \pm 7.9, 15.3 \pm 1.7, 14.4 \pm 3.3)

Kesimpulan : Suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor pada medium fertilisasi *in vitro* dapat meningkatkan angka fertilisasi.

Kata kunci : oosit, kambing, nanopartikel, daun kelor



ABSTRACT

THE SUPPLEMENTATION OF MORINGA LEAF (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) ETHANOL EXTRACT NANOPARTICLE ON THE OOSIT AND THE GOAT SPERMATOZOA TO IN VITRO FERTILIZATION RATE

Tinta Julianawati, Hendy Hendarto, Widjiati

Background: At present in vitro fertilization is believed to be the definitive therapy for infertility. The problem that often occurs in the process of in vitro fertilization (IVF) is the presence of Reactive Oxygen Species (ROS) produced from exogenous factors. One way to overcome this is by providing additional antioxidants. Antioxidant nanotechnology in biomedical applications has the benefit of being the best drug delivery agent and can maximize glutathione (GSH). *Moringa pterygosperma* Gaertn. contains flavonoid compounds. In vitro flavonoids are proven to be able to capture ROS compounds, inhibit protein damage, damage lipid membranes.

Objective: The purpose of this study was to determine the rate of goat oocyte fertilization by the supplementation of moringa leaf ethanol extract nanoparticles on in vitro fertilization medium.

Materials and methods: The subjects of this study used goat oocytes divided into 4 groups consisting of 1 control group and 3 treatment groups. Each group consists of a minimum of 59 oocytes. In the process of in vitro fertilization, the medium used in petri dishes is G-IVF as much as 6 μ L per drop and the addition of Moringa leaf extract nanoparticles with various doses of 50 μ g, 100 μ g, and 150 μ g as much as 5 μ L under OVOIL-TM 100 as much as 2cc. Oocytes and spermatozoa were incubated in an incubator of 5% CO₂, 95% humidity and temperature of 38°C for 22 hours.

Results: The results of the study were the number of fertilized oocytes significantly in the treatment of 100 μ g ($31.9 \pm 2.2\%$) compared to 50 μ g, 150 μ g and the control group (20.6 ± 7.9 , 15.3 ± 1.7 , 14.4 ± 3.3)

Conclusion: Supplementation of moringa leaf ethanol extract nanoparticles on in vitro fertilization medium can increase fertilization rate.

Keywords: oocyte, goat, nanoparticles, *Moringa* leaf



RINGKASAN

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL DAUN
KELOR (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) PADA OOSIT DAN
SPERMATOZOA KAMBING TERHADAP ANGKA
FERTILISASI SECARA *IN VITRO***

Tinta Julianawati

Daun kelor mengandung berbagai zat kimia yang bermanfaat. Fitokimia dalam daun kelor adalah tannin, steroid dan triterpenoid, flavonoid, saponin, antarquion, dan alkaloid, semua senyawa merupakan antioksidan (Vergara *et al.*, 2017). Daun kelor juga memiliki kandungan fenolik yang terbukti efektif berperan sebagai antioksidan. Flavonoid secara *in vitro* terbukti merupakan inhibitor yang kuat pada lipid peroksidasi, menangkap senyawa ROS, menghambat kerusakan protein, kerusakan membran lipid dan pengikatan ion logam. Secara alami oosit menghasilkan *glutathione* (GSH). GSH intraseluler digunakan oosit untuk mencukupi kebutuhan dalam tahapan produksi embrio *in vitro*. Apabila konsentrasi GSH selama pematangan tidak optimal, maka akan menyebabkan akumulasi ROS. Pada spermatozoa, kualitas membran akrosom akan mempengaruhi terjadinya reaksi akrosom. Jika pada membran akrosom terjadi degradasi maka reaksi akrosom akan terganggu. Sehingga proses fertilisasi *in vitro* tidak berjalan dengan baik (Hosseini *et al.*, 2014). Penggunaan antioksidan alami saat ini dianggap lebih aman karena antioksidan alami diperoleh dari ekstrak tanaman. Senyawa aktif herbal dalam bentuk sediaan ekstrak memiliki kelemahan yaitu rendahnya kelarutan dalam air sehingga menurunkan bioavailabilitasnya.

Nanopartikel adalah salah satu strategi untuk meningkatkan bioavailabilitas senyawa aktif herbal. Nanopartikel merupakan partikel koloid padat dengan diameter 1-1000 nm. (Bolshani *et al.*, 2014) Tujuan utama dalam melakukan nanopartikel sebagai sistem penghantar obat adalah untuk mengatur ukuran partikel, sifat-sifat permukaan, dan pelepasan zat aktif pada tempat yang spesifik di dalam tubuh sebagai sasaran pengobatan. Ukuran partikel yang lebih kecil, maka luas permukaan akan meningkat. Permukaan yang lebih besar akan memungkinkan interaksi yang lebih besar sehingga dapat menyebabkan peningkatan kelarutan (Rivzi *et al.*, 2018)

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui angka fertilisasi oosit kambing dengan suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor pada medium fertilisasi *in vitro*.

Penelitian ini merupakan penelitian *true experiment* dengan rancangan *posttest only control group design*. Subjek penelitian menggunakan oosit kambing yang dibagi dalam 4 kelompok terdiri atas 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Setiap kelompok terdiri dari minimal 59 oosit. Pada proses fertilisasi *in vitro*, Medium yang digunakan pada cawan petri adalah G-IVF sebanyak 6 μ L per drop dan penambahan nanopartikel ekstrak daun kelor dengan berbagai dosis

yaitu 50 μ g, 100 μ g, dan 150 μ g sebanyak 5 μ L dibawah OVOIL-TM 100 sebanyak 2cc. Oosit dan spermatozoa diinkubasi di dalam inkubator 5% CO₂, kelembapan 95% dan suhu 38°C selama 22 jam.

Hasil penelitian ini adalah kadar flavonoid pada nanopartikel ekstrak daun kelor pada uji flavon total sebesar (1,97 \pm 1,07)% , ukuran partikel pada nanopartikel ekstrak daun kelor yang diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) sebesar \pm 82,7 nm dan aktivitas antioksidan Ic50 pada nanopartikel ekstrak daun kelor sebesar 451,8 ppm dengan aktivitas peredaman 2,8%.

Uji statistik menunjukkan bahwa jumlah oosit yang terfertilisasi secara signifikan pada perlakuan 100 μ g (31.9 \pm 2.2%) dibandingkan dengan 50 μ g, 150 μ g dan kelompok kontrol sebesar (20.6 \pm 7.9, 15.3 \pm 1.7, 14.4 \pm 3.3). Analisis menggunakan *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa nilai (0,006<0,05). Sehingga hipotesis nol (H₀) ditolak dan hipotesis 1 (H₁) diterima.

Kesimpulan Suplementasi nanopartikel ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) dengan dosis 50 μ g, 100 μ g, dan 150 μ g pada medium fertilisasi dapat meningkatkan angka fertilisasi oosit kambing secara *in vitro*.

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah perlu dilakukan proses isolat dalam pembuatan nanopartikel ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) untuk mendapatkan hasil aktivitas antioksidan yang baik dan dilakukan penelitian lebih lanjut kultur *in vitro* embrio tahap dua sel sampai blastosis menggunakan nanopartikel ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) dengan dosis yang sama 50 μ g, 100 μ g, dan 150 μ g.

SUMMARY

THE SUPPLEMENTATION OF MORINGA LEAF (*Moringa pterygosperma* Gaertn.) ETHANOL EXTRACT NANOPARTICLE ON THE OOSIT AND THE GOAT SPERMATOZOA TO IN VITRO FERTILIZATION RATE

Tinta Julianawati

Moringa leaves contain a variety of beneficial chemicals. Phytochemicals in moringa leaves are tannin, steroids and triterpenoids, flavonoids, saponins, interquinones, and alkaloids are antioxidants (Vergara et al., 2017). Moringa leaves have an effective phenolic role as antioxidants. Flavonoids are strong inhibitors of lipid peroxidation, capture ROS compounds, inhibit protein damage, damage lipid membranes and bind metal ions. Oocytes naturally produce glutathione (GSH). Intracellular GSH is used oocytes to meet the needs in the stages of embryo production in vitro. If the concentration of GSH during maturation is not optimal, it will cause accumulation of ROS. In spermatozoa, the quality of the acrosome membrane will affect the reaction of the acrosome. If the acrosome membrane is degraded, the acrosome reaction will be disrupted. So that the process of in vitro fertilization does not go well (Hosseini et al., 2014). The use of natural antioxidants is now considered safer because natural antioxidants are obtained from plant extracts. Active herbal compounds in the form of extract preparations have the disadvantage of low solubility in water thereby reducing its bioavailability.

Nanoparticles are a strategy to increase the bioavailability of herbal active compounds. Nanoparticles are solid colloidal particles with a diameter of 1-1000 nm. (Bolshani et al., 2014) The main purpose in conducting nanoparticles as a drug delivery system is to regulate particle size, surface properties, and release of active substances at specific places in the body as a treatment target. The smaller particle size, the surface area will increase. A larger surface will allow greater interaction so that it can cause increased solubility (Rivzi et al., 2018)

The purpose of this study was to determine the rate of goat oocyte fertilization by supplementation of moringa leaf ethanol extract nanoparticles on in vitro fertilization medium.

This study is a true experimental study with a posttest only control group design. The research subjects used goat oocytes which were divided into 4 groups consisting of 1 control group and 3 treatment groups. Each group consists of a minimum of 59 oocytes. In the process of in vitro fertilization, the medium used in petri dishes is G-IVF as much as 6 μ L per drop and the addition of Moringa leaf extract nanoparticles with various doses of 50 μ g, 100 μ g, and 150 μ g as much as 5 μ L under OVOIL-TM 100 as much as 2cc. Oocytes and spermatozoa were incubated in an incubator of 5% CO₂, 95% humidity and temperature of 38°C for 22 hours.



The results of this study were the levels of flavonoids in moringa leaf extract nanoparticles in the total flavon test of $(1.97 \pm 1.07)\%$, particle size in moringa leaf extract nanoparticles measured using Particle Size Analyzer (PSA) of ± 82.7 nm and the antioxidant activity of Ic_{50} on moringa leaf extract nanoparticles was 451.8 ppm with a reduction activity of 2.8%.

The statistical results show that the number of fertilized oocytes was significantly in the treatment of 100 μ g ($31.9 \pm 2.2\%$) compared to 50 μ g, 150 μ g and the control group (20.6 ± 7.9 , 15.3 ± 1.7 , 14.4 ± 3.3). Analysis using One Way ANOVA shows that the value ($0.006 < 0.05$). So the null hypothesis (H_0) is rejected and hypothesis 1 (H_1) is accepted. Conclusion Supplementation of moringa leaf ethanol extract (*Moringa pterygosperm Gaertn.*) At doses of 10 mg / ml, 20 mg / ml and 30 mg / ml in the fertilization medium can increase the rate of goat oocyte fertilization in vitro.

Suggestions for further research is that it is necessary to carry out isolate processes in the production of moringa leaf extract (*Moringa pterygosperm Gaertn*) nanoparticles to get good antioxidant activity results and further research in vitro embryo culture in two cell stages until blastocysts using moringa *Moringa pterygosperm extract (Moringa pterygosperma Gaertn.)* With a dose of 50 μ g, 100 μ g, and 150 μ g.