

**ABSTRACT****MORINGA OLEIFERA LEAF NANOPARTICLE SUPPLEMENTATION  
TO MALONDIALDEHYDE LEVELS AND CASPASE-3 EXPRESSION  
DURING IN VITRO MATURATION****Amalia Ratna Kusumaningrum**

Successful in vitro fertilization (IVF) needs high quality mature oocytes for optimum results during in vitro maturation (IVM). If the temperature in the incubator is not optimal, the condition of culture, protein supplementation, pH also becomes not optimal, and leads to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS). Increased ROS due to high temperatures initiates a lipid peroxidation and the end products are malondialdehyde (MDA) levels and leading activation caspase-3 expression. More attention has been given to the antioxidant supplementation such as Moringa oleifera (MO) leaf with nanoparticle during IVM. With small size, nanoparticles shows closer to the surface of damaged cell due to the production of ROS. This study aimed to analyzed the effect of moringa oleifera leaf nanoparticle supplementation to malondialdehyde levels and caspase-3 expression during in vitro maturation. This study was true experimental with post-test only control group design, used goat oocyte, which each the treatment group (n=31) was supplementation dosage 1.0 and 2.0  $\mu\text{M}$  with MO leaf nanoparticle. Maturation process was done in CO<sub>2</sub> incubator 5% at different temperature, 3 groups 38.5°C and 3 groups 41°C for  $\pm 20-22$  hours. The results of the performed statistical test MDA levels (38.5°C p=0.276; 41°C p= 0.001), and caspase-3 expression (38.5°C p=0.046; 41°C p= 0.028) significantly different (p<0.05) with MO leaf nanoparticle supplementation during IVM. Conclusion: supplementation of MO leaf nanoparticle has effect to reduce MDA levels and caspase-3 expression during IVM.



## RINGKASAN

**SUPLEMENTASI NANOPARTIKEL DAUN KELOR (*Moringa Oleifera* Lam.) TERHADAP KADAR MDA (*MALONDIALDEHID*) DAN EKSPRESI CASPASE-3 DALAM TAHAP MATURASI OOSIT SECARA *IN VITRO***

**Amalia Ratna Kusumaningrum**

Teknologi produksi embrio *in vitro* merupakan teknik reproduksi modern yang dimulai dengan maturasi *in vitro* (MIV). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa selama proses MIV, apabila suhu pada inkubator tidak optimal, kondisi kultur, suplementasi protein, pH juga menjadi tidak optimal, dan mengarah pada peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species* / ROS). Peningkatan ROS akibat suhu yang tinggi memulai reaksi berantai peroksidasi lipid. Pembentukan produk peroksidasi lipid secara langsung mempengaruhi sifat fisik dan fungsi membran sel mengakibatkan hilangnya integritas membran, yang secara khusus mempengaruhi fosfolipid yang mengandung PUFA dan menghasilkan pembentukan peroksida lipid yang dapat terurai menjadi produk sekunder *malondialdehyde* (MDA).

Stres oksidatif terjadi ketika produksi ROS melebihi mekanisme pertahanan antioksidan endogen, yang mengakibatkan gangguan dalam proses reduksi / oksidasi (redoks). Radikal ini sangat reaktif dan tidak stabil dan karena itu dapat berinteraksi dengan beberapa molekul untuk memperoleh elektron dalam upaya untuk menjadi stabil. Interaksi ini pada gilirannya dapat mengganggu permeabilitas membran mitokondria dan pembentukan kompleks apoptosom sitokrom C (Cyt C), *Apoptotic Protease-Activating Factor-1* (Apaf-1) dan pro caspase-9, yang akan mengaktifkan caspase-3 dan terjadilah apoptosis.

Tujuan penelitian ini untuk mempelajari pengaruh suplementasi nanopartikel daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) terhadap penurunan kadar MDA dan ekspresi caspase-3 dalam tahap maturasi oosit secara *in vitro*.

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium. Rancangan penelitian ini menggunakan eksperimental murni (*true experimental*) pendekatan *post-test only control group design*. Dalam penelitian ini terbagi dalam 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 31 sampel oosit yang sesuai dengan kriteria inklusi, yaitu kelompok dengan suhu 38,5°C; kontrol (O-1) tanpa suplementasi nanopartikel daun kelor, perlakuan O1 suplementasi nanopartikel daun kelor dengan dosis 1.0 µM, perlakuan O2 suplementasi nanopartikel daun kelor dengan dosis 2.0 µM. Kelompok dengan suhu 41°C; kontrol (O-2) tanpa suplementasi nanopartikel daun kelor, perlakuan O3 suplementasi nanopartikel daun kelor dengan dosis 1.0 µM, perlakuan O4 suplementasi nanopartikel daun kelor dengan dosis 2.0 µM. Pematangan oosit dilakukan di dalam inkubator dengan kelembapan 5% CO<sub>2</sub> selama ±20-22 jam.

Penelitian ini memiliki 2 variabel terikat, yaitu kadar MDA, dan ekspresi caspase-3. Kadar MDA diukur menggunakan ELISA *assay kit*. Ekspresi caspase-3 pada sampel dinilai secara semikuantitatif menggunakan *Immuno Reactive Score*

(IRS) yang merupakan hasil perkalian antara prosentase sel imunoreaktif (A) dengan skor intensitas warna (B) pada sel imunoreaktif.

Hasil rerata $\pm$ SD yang didapatkan pada kadar MDA kelompok suhu 38.5°C, kelompok O1 (2.325) dan O2 (1.831) mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan suplementasi nanopartikel daun kelor dibandingkan dengan kelompok O<sub>-1</sub> (3.004). Hasil rerata $\pm$ SD yang didapatkan pada kadar MDA kelompok suhu 41°C, kelompok O3 (3.395) dan O2 (1.752) mengalami penurunan setelah diberikan perlakuan suplementasi nanopartikel daun kelor dibandingkan dengan kelompok O<sub>-2</sub> (5.09). Hasil rerata ekspresi IRS caspase-3 kelompok suhu 38.5°C, kelompok O1 (1.22) dan O2 (0.93) mengalami penurunan dibandingkan pada kelompok O<sub>-1</sub> (1.83). sedangkan hasil rerata ekspresi IRS caspase-3 kelompok suhu 41°C, kelompok O3 (2.74) dan O4 (2.00) juga mengalami penurunan dibandingkan pada kelompok O<sub>-2</sub> (3.35). Hal ini dapat diartikan bahwa dosis 1.0 dan 2.0  $\mu$ M suplementasi nanopartikel daun kelor mempengaruhi penurunan ekspresi caspase 3 di suhu tinggi.

Hal ini dapat disimpulkan bahwa paparan faktor stres suhu yang tinggi selama proses maturasi *in vitro* terdapat peningkatan kadar MDA dan ekspresi caspase-3. Suplementasi nanopartikel daun kelor dipilih karena aktivitas antioksidannya yang tinggi. Aktivitas antioksidan ini sangat terkonjugasi dengan beberapa gugus hidroksil menjadikan kompon ini donor elektron atau atom hidrogen yang baik, menetralkan radikal bebas dan ROS sehingga terdapat penurunan kadar MDA dan ekspresi caspase-3. Penurunan ini dapat meningkatkan kualitas dan kompetensi oosit, dan tingkat keberhasilan FIV.