

Pengaruh Suplementasi Ekstrak Daun Kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap Ekspansi Kumulus Oosit dalam Medium Maturasi *In Vitro*

Nur Anindya Syamsudi

Ilmu Kesehatan Reproduksi Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga; anindyanindi986@gmail.com
(koresponden)

Widjiati

Departemen Embriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga; widjiati1962@gmail.com

Hendy Hendarto

Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga; hndhendy@yahoo.com

ABSTRACT

Background: Cumulus cells are mediators providing energy transport, micronutrients, and carrier molecules for oocyte development, and mediate the influence of hormones on the oocyte cumulus complex. Cumulus cells play a role during oocyte growth and maturation which shows the quality of oocyte maturation. The use of basic maturation medium with the addition of various substances and compounds has been extensively studied to study oocyte maturation in vitro. Utilization of drugs from natural ingredients has unique advantages because in general cheap prices, have lower toxicity and side effects, and good therapeutic potential. One of the plants that can be used as a source of natural antioxidants, namely Moringa leaves. **Objective:** Determine the effect of supplementation Moringa pterygosperm Gaertn extract on the expansion of oocyte cumulus in in vitro maturation medium. **Method:** This research was true experimental with Post Test Only Control Group Design approach. Divided into 4 groups, namely K: control group, P1: treatment of 10 mg / mL Moringa leaf extract, P2: treatment of 15 mg / mL Moringa leaf extract, and P3: treatment of 20 mg / mL Moringa leaf extract. Furthermore oocytes are matured for 24 hours. Cumulus expansion was evaluated according to the level of expansion achieved where the minimum response (+), medium response (++), and maximum response (+++). Statistical analysis used the One Way Anova test and continued post HoC LSD. **Results:** There was an influence of supplementation Moringa pterygosperm Gaertn extract on the expansion of moderate response cumulus (++) ($p = 0.007$) and maximum response (+++) ($p = 0.000$), but there was no effect on the expansion of cumulus minimal response (+) (0.065). Doses of 20 mg / mL are effective for cumulus expansion (+++), but not effective for cumulus expansion (+), (++), and control. **Conclusion:** Supplementation Moringa pterygosperm Gaertn extract affected the expansion of moderate response (++) and maximum response (+++) oocytes in in vitro maturation medium.

Keywords: moringa leaf extract, cumulus expansion, in vitro maturation.

ABSTRAK

Latar Belakang: Sel kumulus merupakan mediator penyedia transpor energi, mikronutrisi, dan atau molekul pembawa untuk perkembangan oosit, dan menjadi mediasi pengaruh hormon pada kompleks kumulus oosit. Sel kumulus berperan selama pertumbuhan dan maturasi oosit yang menunjukkan kualitas maturasi oosit. Penggunaan medium maturasi dasar dengan penambahan berbagai zat dan senyawa banyak diteliti untuk mempelajari maturasi oosit secara *in vitro*. Pemanfaatan obat dari bahan alam memiliki kelebihan unik karena pada umumnya harga murah, memiliki toksisitas dan efek samping lebih rendah, serta potensi terapeutik baik. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber antioksidan alami, yaitu daun kelor. **Tujuan:** mengetahui pengaruh suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap ekspansi kumulus oosit dalam medium maturasi *in vitro*. **Metode:** Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu K: kelompok kontrol, P1: perlakuan 10 mg/mL ekstrak daun kelor, P2 : perlakuan 15 mg/mL ekstrak daun kelor, dan P3 : perlakuan 20 mg/mL ekstrak daun kelor. Selanjutnya oosit di maturasi selama 24 jam. Ekspansi kumulus di evaluasi sesuai dengan tingkat ekspansi yang dicapai dimana respon minimal (+), respon sedang (++) , dan respon maksimum (+++). Analisa statistik menggunakan uji *one way Anova* dan dilanjutkan *post HoC LSD*. **Hasil:** Terdapat pengaruh suplementasi ekstrak daun kelor terhadap ekspansi kumulus respon sedang (++) ($p=0.007$) dan respon maksimal (+++) ($p=0.000$), namun tidak terdapat pengaruh terhadap ekspansi kumulus respon minimal (+) ($p=0.065$). **Kesimpulan :** Suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) berpengaruh terhadap ekspansi kumulus oosit respon sedang (++) dan respon maksimal (+++) dalam medium maturasi *in vitro*.

Kata kunci: ekstrak daun kelor, ekspansi kumulus, maturasi *in vitro*.

PENDAHULUAN

Pematangan oosit merupakan proses kompleks yang melibatkan siklus perkembangan sel meiosis dan perubahan sitoplasma⁽¹⁾. Kemampuan inti oosit untuk dapat membelah secara meiosis selama proses maturasi oosit sangat bergantung pada stimulasi hormonal terhadap oosit yang berkumulus kompak⁽²⁾. Sel kumulus berperan selama

pertumbuhan dan maturasi oosit yang menunjukkan kualitas maturasi oosit. Sel kumulus merupakan mediator penyedia transpor energi, mikronutrisi, dan atau molekul pembawa untuk perkembangan oosit, dan menjadi mediasi pengaruh hormon pada kompleks kumulus oosit⁽³⁾. Perkembangan sel-sel kumulus menciptakan lingkungan mikro yang sesuai untuk pengaktifan sperma. Maturasi oosit secara *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⁽⁴⁾. Tahap profase pembelahan meiosis pertama dan oosit primer⁽⁵⁾ dalam maturasi oosit sangat rentan terhadap berbagai kontaminasi berbahaya, seperti, obat-obatan, polutan kimia⁽⁶⁾, dan adanya peningkatan radikal bebas⁽⁷⁾. Kondisi medium maturasi *in vivo* tidak dapat ditiru sepenuhnya dalam situasi *in vitro*. *Reactive Oxygen Species* (ROS) dihasilkan oleh faktor endogen, seperti metabolisme sel oosit dan faktor eksogen, seperti bahan kimia yang ditambahkan ke medium, paparan cahaya, hiperoksida, tekanan gas CO₂, dan suhu⁽⁷⁾. Ketidakseimbangan ROS dalam medium maturasi dan pertahanan antioksidan endogen oosit menyebabkan terjadinya jumlah ROS yang berlebihan sehingga menimbulkan keadaan stress oksidatif⁽⁸⁾. Stress oksidatif dalam proses maturasi oosit dapat menyebabkan kerusakan struktur sel seperti sitoskeleton, benang spindel, destabilisasi *maturating promoting factor* (MPF)⁽⁸⁾, kerusakan protein, peroksidasi lipid, dan disfungsi biologis sel.

Manipulasi media kultur *in vitro* dibutuhkan untuk meminimalkan stres oksidatif⁽⁹⁾, dan meningkatkan kemampuan maturasi oosit⁽⁷⁾. Penggunaan medium maturasi dasar dengan penambahan berbagai zat dan senyawa banyak diteliti untuk mempelajari maturasi oosit secara *in vitro*. Pemanfaatan obat dari bahan alam memiliki kelebihan unik karena pada umumnya harga murah, memiliki toksisitas dan efek samping lebih rendah, serta potensi terapeutik baik⁽¹⁰⁾. Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai sumber antioksidan alami, yaitu daun kelor. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kandungan polifenol yang bertindak sebagai antioksidan yaitu fenolik (45,81 mg/g) dan flavonoid (27mg/g) sehingga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi⁽¹¹⁾. Flavonoid merupakan metabolit sekunder pada struktur polifenol yang memiliki efek biokimia, farmasi dan antioksidan⁽¹²⁾.

Hasil penelitian tentang suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap ekspansi kumulus oosit dalam medium maturasi *in vitro* masih belum pernah dilaporkan. Penelitian lain juga mengemukakan bahwa antioksidan daun kelor dapat menghambat jumlah MDA yang dihasilkan sehingga melindungi dari kerusakan yang disebabkan oleh stress oksidatif⁽¹³⁾. Oleh karena itu, senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun kelor memiliki manfaat sebagai antioksidan alami yang membantu dalam mencegah stress oksidatif dalam maturasi oosit secara *in vitro*. Penelitian tentang ekstrak daun kelor dibuat untuk mengetahui pengaruh suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap ekspansi kumulus oosit.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) terhadap ekspansi kumulus oosit dalam medium maturasi *in vitro*.

METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental murni dengan desain penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan pendekatan *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini telah mendapat persetujuan surat izin etik dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dengan nomor 2.KE.113.07.2019. Penelitian ini adalah penelitian eksperimen murni yang terdiri dari 4 kelompok. Kelompok kontrol (K): G-MOPS PLUS (1 mL) + PG 600 (10 IU/mL), Kelompok perlakuan (P1): Medium Kontrol + ekstrak daun kelor (10 mg/mL), Kelompok perlakuan (P2): Medium Kontrol + ekstrak daun kelor (15 mg/mL), dan Kelompok perlakuan (P3): Medium Kontrol + ekstrak daun kelor (20 mg/mL). Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah ovarium kambing yang diambil dari limbah Rumah Potong Hewan (RPH) lokal. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah oosit kambing. Kriteria inklusi : ovarium dari jenis kambing kacang dan semua folikel yang berdiameter 2 – 8 mm. Kriteria eksklusi : ovarium kambing bentuk abnormal dan oosit yang gundul. Penelitian dilakukan di Laboratorium *In Vitro*, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Juni - September 2019.

Persiapan Bahan Uji

1. Sampel tanaman kelor diambil dari wilayah perkebunan di Kota Bangil, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Sampel tanaman kelor dicuci dan dibersihkan untuk dilakukan identifikasi tumbuhan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur dengan nomor 170/IPH.06/HM/I/2019. Tahapan ekstraksi dilakukan dengan metode yaitu maserasi dengan tujuan mendapatkan cara ekstraksi daun kelor dengan hasil yang optimal. Ekstraksi ini dilakukan di Unit Layanan Pengujian (ULP) Farmasi Universitas Airlangga. Daun kelor yang dicuci bersih, dikeringkan dengan suhu 20-25°C sekitar 10 hari sampai mencapai kadar air 10-12%. Serbuk daun kelor/simplisia ditimbang 1000 gram dan tambahkan pelarut etanol 70% (Bratacam, Chemica) dengan perbandingan 1:2 (b/v) hingga terendam. Rendam dan diamkan selama 24 jam pada suhu ruangan. Setelah 24 jam, saring ekstrak hingga didapatkan filtrat hari pertama. Ampas simplisia ditambahkan kembali dengan pelarut 1:2 (b/v). Ulangi prosedur hingga didapatkan filtrat sebanyak 3 hari. Filtrat seluruhnya dari metode maserasi dicampurkan dengan *vacuum rotary evaporator* (Buchi R-300, Switserland) pada suhu 40-45°C sampai 20 °brix selama 20 jam sehingga didapatkan hasil ekstrak. Hasil dari metode ekstraksi diukur total senyawa flavonoid menggunakan spektrofotometri.

- Ovarium kambing yang diperoleh dari RPH lokal disimpan dalam termos. Ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis 0,95% dan proses pengumpulan oosit kemudian dilakukan. Pengumpulan oosit dilakukan dengan aspirasi menggunakan spuit dengan jarum 20G yang mengandung media koleksi GMOPS PLUS (*Vitrolife Product*). Oosit yang terkumpul dimasukkan ke petri steril dan dilanjutkan dengan pengamatan di bawah mikroskop untuk mengamati oosit yang digunakan. Oosit dipindahkan ke dalam media maturasi yaitu G-MOPS PLUS (*Vitrolife Product*) yang diletakkan pada *petridish* steril. Pematangan oosit dilakukan dalam medium maturasi kontrol dan suplementasi ekstrak daun kelor dalam bentuk tetesan (*drop*) masing-masing 50 µl untuk 5-10 oosit dan ditutup dengan OVOIL TM-100 (*Vitrolife Product*). Selanjutnya oosit di maturasi selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 38°C, 5% CO₂ dan kelembaban 95%. Ekspansi kumulat di evaluasi sesuai dengan tingkat ekspansi yang dicapai dimana respon minimal (+), respon sedang (++), dan respon maksimum (+++).
- Analisa data untuk uji normalitas dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk, bila berdistribusi normal dan data homogen menggunakan uji ANOVA dilanjutkan LSD (Least Significant Difference) untuk melihat perbedaan pada semua kelompok.

HASIL

Sampel tanaman kelor diambil dari wilayah perkebunan di Kota Bangil, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur. Sampel tanaman kelor dicuci dan dibersihkan untuk dilakukan identifikasi tumbuhan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, Kabupaten Pasuruan, Jawa Timur dengan nomor 170/IPH.06/HM/I/2019.

Hasil total senyawa flavonoid ekstrak etanol daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) diperoleh hasil (Rerata \pm Relative Percent Difference/ RPD) sebesar $1,97 \pm 1,07$ % dengan absorbansi 1,58.

Hasil aktivitas antioksidan ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) dengan menggunakan uji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Hasil penentuan aktivitas antioksidan diperoleh IC₅₀ sampel 451,8 atau 2,8%.

Ekspansi kumulat adalah variabel dari penelitian yang dihitung secara numerik menggunakan mikroskop fase kontras. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk pada data ekspansi kumulat oosit keempat kelompok. Uji normalitas pada penelitian ini didapatkan hasil $p > 0,05$ pada keempat kelompok maka menunjukkan distribusi data yang normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dan didapatkan hasil $p > 0,05$ pada keempat kelompok maka menunjukkan varian data tersebut homogen. Rata-rata dan standar deviasi ekspansi kumulat respon minimal (+), respon sedang (++), dan respon maksimal (+++) dijelaskan pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata dan standar deviasi suplementasi ekstrak daun kelor pada ekspansi kumulat oosit

Ekspansi Kumulus						
Perlakuan	Total oosit (N)	(+) \pm SD	<i>p</i>	(++) \pm SD	<i>p</i>	(+++) \pm SD
Kontrol	141	13.68 \pm 9.20	0,065	29.44 \pm 8.52	0,007	56.88 \pm 7.03
P1	144	12.06 \pm 1.71		50.63 \pm 11.81		37.31 \pm 11.15
P2	167	4.55 \pm 4.30		22.29 \pm 2.05		73.16 \pm 4.06
P3	135	6.35 \pm 5.02		36.60 \pm 17.17		57.04 \pm 13.17

Signifikansi $p < 0,05$ = berbeda bermakna

Keterangan: P1 : Ekstrak daun kelor dosis 10 mg/ml; P2 : Ekstrak daun kelor dosis 15 mg/ml; P3 : Ekstrak daun kelor dosis 20 mg/ml; (+) : Ekspansi kumulat respon minimal; (++) : Ekspansi kumulat respon sedang; (+++) : Ekspansi kumulat respon maksimal

Tabel 1 menunjukkan rata-rata ekspansi kumulat respon minimal (+) tertinggi adalah pada kelompok kontrol dengan 13,68. Rata-rata ekspansi kumulat respon minimal (+) terendah adalah pada kelompok P2 dengan 4,55. Rata-rata ekspansi kumulat respon sedang (++) tertinggi adalah pada kelompok P1 dengan 50,63. Rata-rata ekspansi kumulat respon sedang (++) terendah adalah pada kelompok P2 dengan 22,29. Rata-rata ekspansi kumulat respon maksimal (+++) terendah adalah pada kelompok P1 dengan 37,31. Rata-rata ekspansi kumulat respon maksimal (+++) tertinggi adalah pada kelompok P2 dengan 73,16.

Hasil uji one way Anova menunjukkan nilai signifikansi $p = 0,065$ ($p > 0,05$) pada ekspansi kumulat respon minimal (+), nilai signifikansi $p = 0,007$ ($p < 0,05$) pada ekspansi kumulat respon sedang (++) , dan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($p < 0,05$) pada ekspansi kumulat respon maksimal (+++). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada ekspansi kumulat respon sedang (++) dan maksimal (+++), namun tidak terdapat perbedaan bermakna pada ekspansi kumulat respon minimal (+). Kemudian dilanjutkan uji *Post-Hoc* LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui adanya perbandingan perbedaan dosis pada tiap kelompok.

Tabel 2 menunjukkan hasil dari uji *Post-Hoc* LSD menunjukkan rata-rata ekspansi kumulat respon sedang (++) terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikan $p < 0,05$, yaitu antara kelompok kontrol dan kelompok P1 dengan nilai $p = 0,009$, antara kelompok P1 dan kelompok P2 dengan nilai $p = 0,001$ tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok P2 dengan nilai $p = 0,332$, antara kelompok kontrol dan kelompok P3 dengan nilai $p = 0,331$, antara kelompok P1 dan kelompok P3 dengan nilai $p = 0,067$, antara kelompok P2 dan kelompok P3 dengan $p = 0,062$. Hal tersebut berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok P1 dan P2 terhadap ekspansi kumulat respon sedang (++) .

Tabel 2. Hasil uji Anova dan post HoC LSD ekspansi kumulatif respon sedang (++)

Kelompok perlakuan	Nilai <i>p</i>			
	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol	-	0.009*	0.332	0.331
P1	0.009*	-	0.001*	0.067
P2	0.332	0.001*	-	0.062
P3	0.331	0.067	0.062	-

Signifikansi $p < 0,05$ = berbeda bermakna

Tabel 3 menunjukkan hasil dari uji *Post-Hoc* LSD menunjukkan rata-rata ekspansi kumulatif respon maksimal (+++) terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai signifikan $p < 0,05$, yaitu antara kelompok kontrol dan kelompok P1 dengan nilai $p = 0,005$, antara kelompok kontrol dan kelompok P2 dengan nilai $p = 0,016$, antara kelompok P1 dan kelompok P2 dengan nilai $p = 0,000$, antara kelompok P1 dan kelompok P3 dengan nilai $p = 0,005$, antara kelompok P2 dan kelompok P3 dengan nilai $p = 0,017$ tetapi tidak ada perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan kelompok P3 dengan nilai $p = 0,980$. Hal tersebut berarti bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok P1, P2 dan P3 terhadap ekspansi kumulatif respon maksimal (+++).

Tabel 3. Hasil uji Anova dan post HoC LSD ekspansi kumulatif respon maksimal (+++)

Kelompok perlakuan	Nilai <i>p</i>			
	Kontrol	P1	P2	P3
Kontrol	-	0.005*	0.016*	0,980
P1	0.005*	-	0.000*	0.005*
P2	0.016*	0.000*	-	0.017*
P3	0,980	0.005*	0.017*	-

Signifikansi $p < 0,05$ = berbeda bermakna

PEMBAHASAN

Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan⁽¹⁴⁾. Analisis kuantitatif untuk menentukan jumlah flavonoid yang terdapat dalam ekstrak etanol daun kelor memiliki efek aktivitas antioksidan. Hal ini berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa semakin tinggi kandungan flavonoid total suatu bahan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya⁽¹⁵⁾. Beberapa penelitian juga menunjukkan adanya hubungan antara kadar total flavonoid yang terkandung dengan aktivitas antioksidannya. Ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) memiliki aktivitas antioksidan tergolong dalam kategori lemah. Kuat atau lemahnya aktivitas antioksidan suatu senyawa dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu komposisi kimia. Komposisi kimia juga dipengaruhi oleh kondisi habitat yang meliputi cahaya, temperatur, dan tempat pembudidayaan⁽¹⁵⁾.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa suplementasi ekstrak daun kelor berpengaruh terhadap peningkatan ekspansi kumulatif respon sedang (++) dan respon maksimal (+++), namun tidak berpengaruh terhadap ekspansi kumulatif respon minimal (+). Pengamatan tingkat ekspansi kumulatif karena ekspansi kumulatif merupakan salah satu indikator oosit telah matang⁽¹⁶⁾. Sel kumulatif berperan dalam proses perkembangan dan maturasi oosit. Pada proses maturasi oosit, kumulatif berperan sebagai mediator transpor energi, mikronutrisi, molekul pembawa untuk perkembangan oosit⁽³⁾, dan hormon yang diperlukan dalam proses perkembangan dan maturasi oosit melalui *gap junction communication*. Hal ini sesuai dengan pendapat bahwa utuhnya sel-sel kumulatif yang mengelilingi oosit *immature*, dapat tercipta lingkungan seluler yang sesuai untuk proses maturasi oosit, karena metabolisme bersama antara oosit dan sel-sel kumulatif menghasilkan nutrisi yang berperan penting selama maturasi oosit⁽²⁾.

Peningkatan ekspansi kumulatif oosit terjadi karena senyawa aktif yang terkandung dari ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) mempunyai mekanisme antioksidan yang mampu meredam ROS yang dihasilkan selama maturasi secara *in vitro* dan mencegah kerusakan akibat stres oksidatif dan berdifusi melalui sel kumulatif. ROS secara alami diproduksi selama metabolisme seluler oosit, namun lebih banyak diproduksi akibat paparan faktor-faktor eksternal selama penanganan oosit secara *in vitro*⁽¹⁷⁾. Faktor eksternal, seperti manipulasi oosit, tekanan oksigen, dan cahaya mengarah ke peningkatan stres oksidatif yang dapat merusak metabolisme oosit. ROS mampu berdifusi melewati membran sel⁽⁸⁾ dan memodifikasi protein, lipid, dan asam nukleat⁽¹⁸⁾ dengan mengambil elektronnya sehingga menjadi tidak stabil, sedangkan pertahanan antioksidan bawaan pada embrio tidak cukup untuk mengatasi stres oksidatif yang ditemui selama kultur *in vitro*⁽¹⁹⁾. Kemampuan maturasi oosit dapat ditingkatkan dengan menambahkan berbagai zat dan senyawa ke medium IVM⁽⁷⁾. Hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa kandungan polifenol daun kelor yang bertindak sebagai antioksidan tinggi yaitu fenolik dan flavonoid⁽¹¹⁾. Quercetin merupakan komponen fenolik yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi dan sangat reaktif terhadap ROS bereaksi dengan radikal bebas dengan menyumbangkan proton dan menjadi radikal bebas, namun radikal bebas yang dihasilkan dihilangkan oleh resonansi sehingga membuat radikal quercetin lemah, kurang efektif dan memiliki energi minimum. Hal ini juga didukung oleh penelitian bahwa aktivitas antioksidan daun kelor secara signifikan dapat mengurangi kerusakan DNA yang diinduksi oleh oksidator H_2O_2 ⁽²⁰⁾. Penelitian terbaru juga mengemukakan bahwa antioksidan daun kelor dapat menghambat jumlah MDA yang dihasilkan sehingga melindungi dari kerusakan yang disebabkan oleh stres oksidatif⁽¹⁵⁾. Selain itu, antioksidan daun kelor mencegah peningkatan tingkat oksidasi

peroksidase lipid dan penurunan konsentrasi glutathione. Tanda oosit *mature* yaitu adanya ekspansi sel-sel kumulus. Sel-sel kumulus distimulasi oleh *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *growth factor* untuk memproduksi dan mensekresikan *hyaluronic acid* (HA) yang menyebabkan ekspansi⁽²⁾. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa proses pematangan oosit merupakan respon pada LH surge dan sekresi HA oleh sel kumulus⁽²¹⁾. Fungsi HA melalui ikatan protein (CD44) bertanggung jawab atas penghambatan apoptosis, proliferasi, dimulainya kembali meiosis, dan pematangan sitoplasma oosit (ekspansi kumulus). Ketika HA terhidrasi, jarak antara sel kumulus menjadi lebih besar dan sel tertanam ke dalam lendir matriks yang dinamakan ekspansi kumulus. Sel kumulus sangat berperan dalam maturasi oosit dengan jalan mempengaruhi kelanjutan meiosis dan maturasi sitoplasma. Fungsi ini berkaitan dengan adanya *gap junction* dan kemampuan metabolisme. *Gap junction* berperan dalam transfer nutrisi dan faktor penting dalam perkembangan oosit⁽²²⁾. Hal ini didukung oleh penelitian bahwa resveratrol dan melatonin sebagai antioksidan dapat meningkatkan ekspansi kumulus dan perluasan dari granulosa melalui aktivasi persinyalan *sonic hedgehog* (Shh)⁽²³⁾. Ekspansi sel kumulus dan pematangan inti oosit berkorelasi dengan kompetensi perkembangan oosit. Selain itu, ekspansi kumulus dan pematangan inti (tahap MII) adalah faktor penting dalam menentukan kompetensi perkembangan oosit⁽²¹⁾.

Dosis maksimal yang diberikan tergantung pada ekspansi kumulus oosit yang terlihat hingga 20 mg/ml yang berpengaruh terhadap ekspansi kumulus respon maksimal (+++). Perbedaan tersebut dapat terjadi karena perbedaan kuantitas senyawa aktif yang terkandung dari setiap ekstrak daun kelor pada medium maturasi penelitian ini berbeda sehingga efek yang diberikan juga akan berbeda. Hal ini dikarenakan sel kumulus merupakan mediator penyedia transpor energi, mikronutrisi, dan atau molekul pembawa untuk perkembangan oosit, dan menjadi mediasi pengaruh hormon pada kompleks kumulus oosit⁽³⁾. Penelitian lainnya menggunakan ekstrak *papaver rhoeas* terhadap IVM menunjukkan pada konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 50 µg/ml secara signifikan tidak dapat meningkatkan tingkat kematangan oosit⁽²⁴⁾. Jika dibandingkan dengan penelitian ini dosis yang digunakan pada penelitian sebelumnya lebih kecil. Dosis minimal pada penelitian ini adalah 10 mg/ml dan dosis maksimal pada penelitian ini adalah 20 mg/ml. Hal ini sesuai dengan pernyataan bahwa molekul senyawa bioaktif memiliki pembersihan sistemik yang tinggi, memerlukan aplikasi berulang dan dosis tinggi⁽¹⁰⁾. Hal ini juga dikarenakan perbedaan kuantitas senyawa aktif juga berpengaruh pada metabolisme sel secara keseluruhan⁽²²⁾. Selain itu, adanya rangsangan dosis yang meningkat terus-menerus menyebabkan peningkatan metabolisme sel melalui sel kumulus untuk meningkatkan tingkat kematangan oosit⁽²⁵⁾.

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa suplementasi ekstrak daun kelor (*Moringa pterygosperma* Gaertn) berpengaruh terhadap ekspansi kumulus oosit respon sedang (++) dan respon maksimal (+++) dalam medium maturasi *in vitro* dan untuk penelitian selanjutnya di sarankan di lakukan penelitian dengan menambah jumlah variasi dosis untuk mengetahui toksisitas dan efikasi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Zhang R, Pang B, Xu S, Wan P, Guo S, Ji H, Yang Q. Theriogenology The CXCL12-CXCR4 signaling promotes oocyte maturation by regulating cumulus expansion in sheep. *Theriogenology*. 2018;107:85–94.
2. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos: Maturing the oocyte. Cambridge: CABI publishing; 2003.
3. Baszary CDU, Sumitro SB, Djati MS, Widjajanto E. Induction Effect of Epidermal Growth Factor (EGF) Against Cx43 Protein During the Cumulus Cell Expansion. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 2012;6(1):36-40.
4. Hammam AM, Whisnant CS, Elias A, Zaabel SM, Hegab AO, Abu-El Naga EM. Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffaloes (*bubalus bubalis*). *J. Anim. Vet. Adv.* 2010;9: 27-31.
5. Schatten H, Gheorghe MC. *Comparative Reproductive Biology*. Australia: Blackwell Publishing; 2007.
6. Wang H, Zhao W, Liu J, Tan P, Zhang C, Zhou B. Chemosphere Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice. *Chemosphere*. 2017;186:911–918.
7. Barakat IAH, Alajmi RA, Zoheir KMA, Salem LM, Al-Hemidiy AR. Gene expression and maturation evaluation of sheep oocytes cultured in medium supplemented with natural antioxidant source. *South African Journal of Animal Science*. 2018;48(2):261. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i2.7>
8. Khazaei M, Aghaz F. Reactive Oxygen Species Generation and Use of Antioxidants during In Vitro Maturation of Oocytes. *International Journal of Fertility and Sterility*. 2017;11(2):63–70.
9. Naseer Z, Ahmad E, Ipek E, Akosy M. Theriogenology Quercetin supplemented diet improves follicular development , oocyte quality , and reduces ovarian apoptosis in rabbits during summer heat stress. 2017;96: 136–141.
10. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Vangelie E, Campos R, Rodriguez P, Grillo R. Nano based drug delivery systems : recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. 2018;16(71):1–33.
11. Sreelatha S, Padma PR. Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2009;64:303–311.

12. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoid: An Overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016;5(e47):1–15.
13. Leone A, Spada A, Battezzati A, Schiraldi A, Aristil J, Bertoli S. *Cultivation, Genetic, Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Leaves: An Overview*. International Journal of Molecular Sciences. 2015.
14. Mir SA, Bhat AS, Ahangar AA. A simplified 2, 4-Dinitrophenylhydrazine Assay for Flavonoids and its Comparison with a Standard Flavonoid Assay. *International Journal of PharmTech Research*. 2014;6(2):751-758.
15. Erukainure OL, Oke OV, Ajiboye AJ. *Nutritional Qualities and Phytochemical Constituents of Clerodendrum Volubile, A Tropical Nonconventional Vegetable*. International Food Research Journal. 2011;18(4):1393-1399.
16. Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulation of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction*. 2008;14(2):159-177.
17. Combelles CMH, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the invitro maturation of oocytes? *Reprod. BioMed*. 2009.
18. Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the patophysiology of human reproduction. *Fert Ster*. 2003;79:829-843.
19. Rajesh T, Anthony T, Kayalvizhi N, Paramasamy G. Influence of medium and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus lincheniformis* AnBa9, *Bioresource Technology*. 2009;100:872-877.
20. Otoluwa *et al.* Effect of *Moringa Oleifera* Leaf Extracts Supplementation in Preventing Maternal DNA Damage. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 2014.
21. Aghaz F, Hajarian H, Shabankareh HK, Abdolmohammadi A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation , and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. *Theriogenology*. 2015;84:1631–1635.
22. Lv L, Wenbin Y, Wenzhong L, Youshe R, Fuzhong L, Kyung-Bon L, Goerge WS. Effect of oocyte selection, estradiol and antioxidant treatment on *in vitro* maturation of oocyte collected from prepubertal boer goats. *Italian J Anim Sci*. 2010;9(11):50-53.
23. Lee S, Jin J, Taweechaipaisankul A, Kim GA, Lee BC. Synergistic effects of resveratrol and melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology*2018;114:191–198.
24. Eimani AG, Eimani H, Samadi F, Hasani S, Shahverdi AH, Yazdi PE, Kamalinejad M. Effect of Papaver rhoeas extract on *in vitro* maturation and developmental competence of immature mouse oocytes. *Reprod Med Biol*. 2010;9:211–215.
25. Stetina JRV, Orr-weaver TL. Developmental Control of Oocyte Maturation and Egg Activation in Metazoan Models. 2011;1–19.