

Pengukuran PFRET Menggunakan Metode *Sensitized Emission* dalam Pengamatan Perubahan Kalsium Pada Oosit

Nathania Nanasari^{1)*}, Djoko Herry Santjojo²⁾, Chomsin Sulistiya Widodo²⁾, Hari Soepriandono³⁾

¹⁾ Program Magister Ilmu Fisika, Jurusan Fisika, Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

²⁾ Jurusan Fisika Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

³⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya

Diterima 22 Mei 2014, direvisi 20 September 2014

ABSTRAK

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) adalah proses transfer energi non radiasi dari molekul donor ke akseptor tanpa melibatkan foton. FRET dapat digunakan untuk mengetahui keberadaan kalsium pada oosit. Diasumsikan kalsium sebagai donor dan fluo-3 (indikator kalsium) sebagai akseptor. FRET dideteksi menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM)*. FRET dapat diukur secara kuantitatif menggunakan metode *sensitized emission*. Ketika FRET terjadi, emisi donor menurun, sedangkan emisi akseptor meningkat (*sensitized emission*). Pengukuran FRET secara kuantitatif menghasilkan nilai PFRET (*Precision FRET*). Tujuan dari artikel ini adalah menawarkan metode *sensitized emission* untuk mengetahui perubahan kalsium pada perkembangan oosit muda ke matang dari oosit kambing. Nilai PFRET yang lebih besar menunjukkan lebih banyak kalsium yang terkandung di dalamnya. Nilai PFRET pada oosit muda 622,5 dan pada oosit matang 754,57.

Kata kunci : FRET, *sensitized emission*, PFRET, kalsium, fluo-3

ABSTRACT

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) is a process of non radiative energy transfer from donor molecule to an acceptor. We expect to know the quantitative FRET measurements in immature and mature goat oocyte with the presence of calcium. FRET was detected using a laser scanning confocal microscope. We assume that calcium as a donor and fluo-3 as an acceptor. The methods of sensitized emission have been used for quantitative FRET measurement. We also describe the precision FRET (PFRET) data analysis. The value of PFRET describe the presence of calcium in immature and mature oocytes. For these immature and mature oocytes, the results of PFRET are 622,5 and 754,57 respectively. Mature oocyte has more calcium than immature oocyte.

Keywords : FRET, sensitized emission, PFRET, calcium, fluo-3

PENDAHULUAN

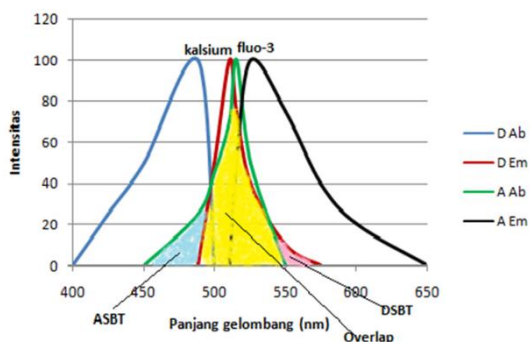
Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) adalah proses transfer energi non radiasi dari molekul donor ke akseptor. FRET melibatkan transfer energi dari donor dalam keadaan tereksitasi ke akseptor terdekat [1]. Banyak metode telah diterapkan dalam mengukur FRET, seperti *sensitized emission*, *acceptor photobleaching*, *FRET ratio* [2].

*Corresponding author:

E-mail: nathania.nanasari@yahoo.com

Salah satu kondisi penting agar FRET terjadi adalah tumpang tindih dari spektrum emisi dari donor dengan spektrum penyerapan akseptor. Ketika FRET terjadi, emisi donor menurun, sedangkan emisi akseptor meningkat (*sensitized emission*). Akibat dari spektrum tumpang tindih, sinyal FRET selalu terkontaminasi oleh emisi donor yang masuk ke filter akseptor dengan panjang gelombang eksitasi (Gambar 1). Sinyal-sinyal ini disebut *sinyal spectral bleed-through (SBT)* akseptor. Selain SBT, sinyal FRET dalam filter akseptor juga memerlukan koreksi untuk variasi sensitivitas spektral filter donor dan akseptor

[3].



Gambar 1. Gambaran umum spektrum absorpsi dan emisi. (Keterangan : **D ab** = absorpsi donor, **D em** = emisi donor, **A ab** = absorpsi akseptor, **A em** = emisi akseptor)

FRET dapat digunakan untuk menggambarkan keberadaan kalsium yang ada di oosit. Kalsium berperan sebagai donor dapat teramati dengan pemberian fluo-3 yang berperan sebagai akseptor. Keberadaan kalsium dapat diamati melalui transfer energi non radiasi menggunakan alat *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) [4].

Di dalam sel, selalu terdapat kalsium yang secara aktif dikeluarkan dari sel dan dikirim dari sitosol ke Retikulum Endoplasma (RE). Proses pematangan oosit menyebabkan struktur RE berubah dan meningkatkan pelepasan kalsium yang penting dalam pelepasan sperma dan oosit [5].

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengukuran FRET secara kuantitatif dengan menggunakan metode *sensitized emission* untuk mengetahui nilai PFRET pada oosit muda dan matang dari oosit kambing. Nilai PFRET menunjukkan banyaknya kalsium pada oosit. Diasumsikan kalsium sebagai donor dan fluo-3 sebagai akseptor. Artikel ini menawarkan metode *sensitized emission* yang dapat digunakan untuk mengetahui perubahan kalsium pada perkembangan oosit muda ke oosit matang.

METODE PENELITIAN

Bahan dan alat. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ovarium kambing, NaCl fisiologis, PBS *free calsium*, dan fluo-3. Alat yang digunakan antara lain *waterbath*, *dissposable syringe* 5 ml dengan ukuran jarum 21 G, mikroskop, *mikrohematokrit*, cawan petri,

Persiapan sampel oosit. Ovarium kambing yang didapat dari Rumah Potong Hewan (RPH) dibersihkan dari organ-organ yang melekat, darah, dan lemak. Ovarium dicuci dengan NaCl fisiologis yang mengandung antibiotik dan ditutup dengan aluminium foil. Ovarium ditempatkan di *waterbath* 38°C. Oosit diambil secara aspirasi dengan ditusuk *dissposable syringe* 5 ml dengan ukuran jarum 21 G. Seleksi oosit dilakukan menggunakan mikroskop *inverted* dengan memindahkannya menggunakan *mikrohematokrit*. Oosit yang dipilih dipindahkan ke cawan petri lain yang diberi *PBS free calsium*. Sampel yang didapat adalah oosit muda.

Oosit matang didapatkan dari oosit muda yang dimatangkan secara *in vitro*. Medium standar untuk pematangan oosit dibuat dengan mencampurkan 8 ml TCM-199 + 1 ml FBS+ 1 ml venskep dengan pH 7,6-7,8. Medium diinkubasi minimal 2 jam. Oosit muda dipindahkan ke dalam medium drop. Kemudian, oosit diinkubasi selama 26 jam pada inkubator CO₂ 5% dengan suhu 39°C. Sampel yang didapat adalah oosit matang.

Fluo-3 merupakan indikator kalsium. Pemberian fluo-3 pada oosit dilakukan di tempat yang gelap. Setelah diberi fluo-3, oosit ditutup rapat dengan aluminium foil dan dibiarkan seitar 30 menit.

Pengamatan FRET. FRET diamati dengan *Confocal Laser Scanning Microscope* dan *software FluoView* untuk akuisisi citra. Bagian dari oosit yang diamati adalah zona pelusida. Daerah pengukuran merupakan daerah yang diberi garis merah sepanjang zona pelusida. Pengukuran FRET secara kuantitatif menggunakan metode *sensitized emission*. Untuk eksitasi donor, digunakan laser HeNe, 488 nm (λ_D) dan 515 nm (λ_A) untuk eksitasi akseptor.

Tabel 1. Tujuh akuisisi citra

λ eksitasi	Sampel	Citra emisi donor	Citra emisi akseptor
488 nm	Oosit	a	b
	Fluo-3	-	c
	Oosit + fluo-3	e	f
515 nm	Fluo-3	-	d
	Oosit + fluo-3	-	g

PFRET merupakan daerah di mana FRET

benar-benar terjadi dengan mengeliminasi daerah yang bukan FRET.

$$PFRET = UFRET - DSBT - ASBT \quad (1)$$

UFRET (f) adalah *uncorrected* FRET.

$$DSBT = ([b]/[a]) \times [e] \quad (2)$$

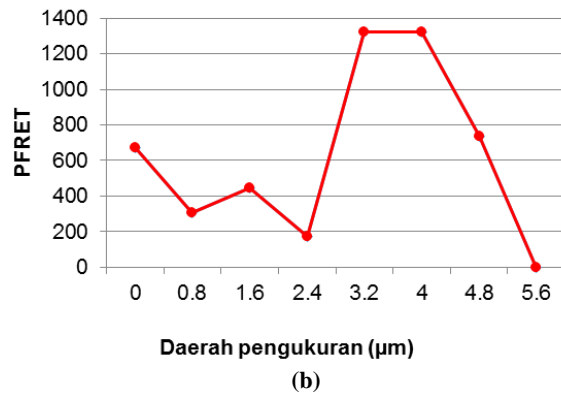
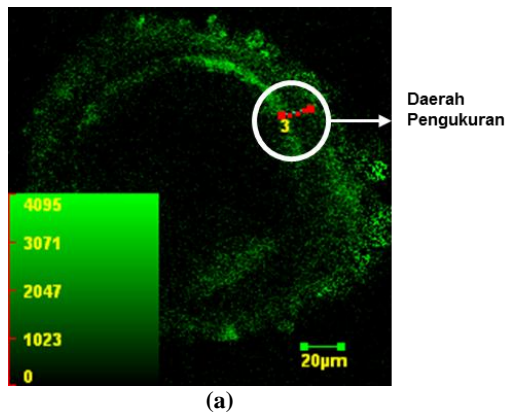
DSBT (*Donor spectral bleed-through*) Koreksi ASBT mengikuti pendekatan yang sama seperti DSBT menggunakan tiga citra.

$$ASBT = ([c]/[d]) \times [g] \quad (3)$$

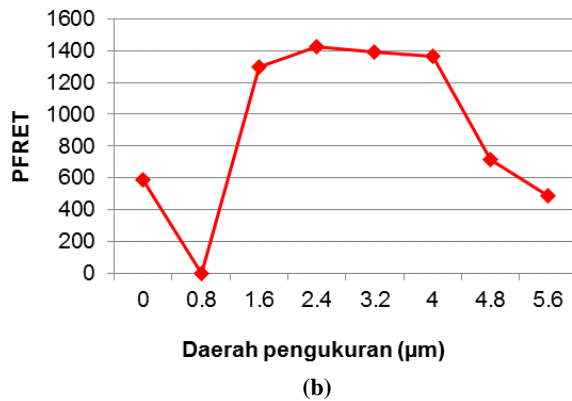
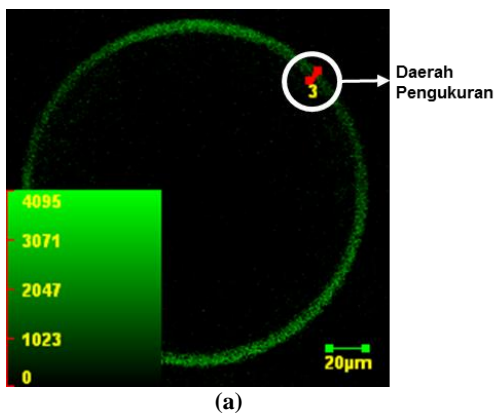
ASBT (acceptor spectral bleed-through) [3].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Akuisisi citra a hingga g pada Tabel 1 yang telah dilakukan pada oosit muda dan matang dengan metode *sensitized emission* akan menghasilkan citra PFRET. PFRET pada oosit muda dan matang dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3 serta Tabel 2.



Gambar 2. PFRET pada oosit muda (a) Citra PFRET dan (b) Grafik data PFRET



Gambar 3. PFRET pada oosit matang (a) Citra PFRET dan (b) Grafik data PFRET

Tabel 2. Hasil Pengukuran PFRET pada oosit muda dan matang.

	Oosit muda	Oosit matang
Rata-rata	622,5	754,57
Maksimum	1325	1424
Minimum	0	0

Peristiwa FRET (transfer energi secara non radiasi) dapat terjadi apabila ada donor yang mentransferkan energi non radiasinya ke akseptor. Dengan menganggap kalsium sebagai donor dan fluo-3 sebagai akseptor, maka energi non radiasi kalsium ditransfer ke fluo-3

sehingga terjadi FRET. PFRET (*precision FRET*) merupakan wilayah FRET yang benar-benar terjadi dengan membuang daerah yang bukan FRET. Nilai PFRET menunjukkan adanya kalsium pada oosit. Sampel dianalisa dengan menandai bagian yang akan diteliti yaitu pada bagian zona pelusida. Daerah pengukuran merupakan daerah yang ditandai oleh garis merah sepanjang 5,796 µm (Gambar 2a dan Gambar 3a). Citra PFRET (Gambar 2a dan Gambar 3a) menunjukkan pencitraan dari nilai PFRET yang ditampilkan dalam skala warna hitam hingga hijau. Nilai intensitas dari

PFRET ditunjukkan dalam bentuk grafik (Gambar 2b dan Gambar 3b) menunjukkan banyaknya kalsium yang terkandung pada oosit muda dan matang. Nilai rata-rata PFRET pada oosit muda 622,5 dan pada oosit matang 754,57. Nilai PFRET pada oosit matang lebih besar bila dibandingkan pada oosit muda. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kalsium pada oosit matang lebih banyak bila dibanding pada oosit muda. Hasil pengukuran PFRET maksimum menunjukkan jumlah maksimum kalsium yang terkandung dalam oosit pada suatu titik daerah pengukuran.

Perubahan biokimia dan struktural yang terjadi selama proses pematangan oosit berpengaruh pada kemampuan oosit untuk meningkatkan konsentrasi kalsium di sitoplasma. Struktur Retikulum Endoplasma akan berubah selama proses pematangan dan akan berpengaruh pada kemampuan Retikulum Endoplasma untuk melepas kalsium. Peningkatan konsentrasi kalsium merupakan hal yang penting dalam peleburan membran antara sperma dan oosit [5].

KESIMPULAN

Metode *sensitized emission* dapat digunakan untuk mengukur PFRET yang menunjukkan perubahan kalsium pada perkembangan oosit muda ke oosit matang. Nilai PFRET pada oosit muda 622,5 dan pada oosit matang 754,57. Jumlah kalsium pada oosit matang lebih banyak dibanding pada oosit

muda.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Laboratorium LSIH dan staff Fisika Universitas Brawijaya yang telah membantu kelancaran penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Nagy, P., G. Vámosi, A. Bodnár, S. J. Lockett, and J. Szöllo"si (1998), Intensity based energy transfer measurements in digital imaging microscopy, *J. Biophysics*, 27(8): 377-389.
- [2] Berney, C., and G. Danuser (2003), FRET or no FRET: A quantitative comparison, *J. Biophysical*, 84(6): 3992.
- [3] Elangovan, M., H. Wallrabe, Y. Chen, R. N. Day, M. Barroso, and A. Periasamy (2003), Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy, *Science Direct*, 29(1): 58-73
- [4] Carrol, J., K. Swann, D. Whittingham, and M. Whitaker (1994), Spatiotemporal dynamics of intracellular $[Ca^{2+}]_i$ oscillations during the growth and meiotic maturation oocytes, *Great Britain The Company of Biologists* 120: 3507-3517.
- [5] Fraser, L. (1982), Ca^{2+} is required for mouse sperm capacitation and fertilization in vitro, *J Androl.*, 3(6): 412-419.