

PENGARUH PENYUNTIKAN KOMBINASI TESTOSTERON UNDEKANOAT DAN DEPOT MEDROKSI PROGESTERON ASETAT TERHADAP AKTIVASI PROTEIN CASPASE-3 SEL GERMINAL TESTIS TIKUS (*Rattus sp.*)

Rismadefi Woferst*, Nukman Moeloek, Asmarinah

PSIK Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Riau Pekanbaru. Indonesia. *Email: rismadefi@unri.ac.id; rismadefi@yahoo.co.id

ABSTRACT

Testosterone undecanoate and depot medroxyprogesterone acetate combinations resulting in azoospermia caused by apoptosis through activation of caspase-3 protein. The present study was designed to investigate caspase-3 activation in rat testis germ cell after testosterone undecanoate and depot medroxyprogesterone acetate administration and to analyze correlation between caspase-3 activation and rat sperm concentration. The Sprague-Dawley rats was administered with 2,5 mg testosterone undecanoate at 6 week intervals and 1,25 mg depot medroxyprogesterone acetate at 12 week intervals. They were randomly divided into five groups i.e K0 (pre-treatment), K1 (6 weeks suppression after induced), K2 (12 weeks suppression after induced), K3 (18 weeks suppression after induced) and K4 (24 weeks suppression after induced). Each treatment had a control. Activation of caspase-3 on testis was evaluated by Immunohistochemistry method. Epididimal sperm concentrations was also calculated. The result of analysis of variants showed that there were no statistical differences among five treatment (K0, K1, K2, K3 dan K4) ($p>0,05$). But there were statistical differences between K3 and its control as well as K4 and its control ($p<0,05$). From data analysis we found that there was correlation but not significant between caspase-3 germ cell which cause decreasing of rat sperm concentration. Testosterone undecanoate and depot medroxyprogesterone acetate administration can cause caspase-3 activation in rat testis germ cells. Increasing of caspase-3 activation can tendency decrease of rat sperm concentration in 12 weeks suppression after induced.

Key word: Testosterone undecanoate, depot medroxyprogesterone acetate, spermatogenesis, caspase-3

ABSTRAK

Pencapaian azoospermia karena pemberian hormon juga dapat terjadi melalui peningkatan peristiwa apoptosis pada sel geminal. Berdasarkan hal tersebut diduga penyuntikan TU+DMPA yang menyebabkan azoospermia disebabkan oleh apoptosis melalui aktivasi protein caspase-3. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivasi protein caspase-3 pada sel germinal testis setelah penyuntikan testosteron undekanoat dan depot medroksiprogesteron asetat pada tikus dan menganalisis hubungan aktivasi protein caspase-3 terhadap konsentrasi spermatozoa tikus (*Rattus sp.*) Penelitian ini menggunakan tikus (*Rattus sp.*) jantan strain Sprague-Dawley dengan beberapa kondisi perlakuan penyuntikan kombinasi TU+DMPA. Masing-masing perlakuan disertai dengan kontrolnya. TU diberikan dengan dosis 2,5 mg setiap 6 minggu sekali sedangkan DMPA 1,25 mg setiap 12 minggu. Analisis evaluasi aktivasi protein caspase-3 pada testis melalui teknik Immunohistokimia. Selain itu juga dilakukan perhitungan konsentrasi sperma epididimis. Pada penelitian ini tidak terdapat adanya perbedaan antara kelima kelompok perlakuan yang diuji (K0, K1, K2, K3 dan K4) ($p>0,05$). Perbedaan bermakna terdapat pada K3 dan K4 dengan kelompoknya masing-masing ($p<0,05$). Dan dari hasil analisis data didapatkan adanya korelasi negatif antara konsentrasi spermatozoa dengan sel germinal positif caspase-3 ($p=0,684$). Dengan demikian penyuntikan kombinasi TU+DMPA dapat meningkatkan aktivasi protein caspase-3 pada sel germinal. Peningkatan aktivasi protein caspase-3 cenderung mengakibatkan penurunan jumlah konsentrasi spermatozoa tikus pada penekanan 12 minggu setelah penyuntikan.

Kata kunci: testosteron undekanoat, depot medroksiprogesteron asetat, spermatogenesis, caspase-3

PENDAHULUAN

Pencapaian azoospermia karena pemberian hormon androgen saja atau dikombinasikan juga dapat terjadi melalui peningkatan peristiwa apoptosis pada sel germinal (Ge *et al.*, 1999). Induksi apoptosis dapat terjadi secara eksternal dan internal (Reed, 2000). Jalur eksternal dapat dimulai oleh Fas ligand (FasL) atau *tumor necrosis factor α* (TNF α) (Pentikäinen, 2002). Jalur mitokondria dapat terjadi akibat respon terhadap rangsang intraselular (Hengartner, 2000). Kedua jalur tersebut akan menginduksi apoptosis dengan mengaktifkan caspase inisiator. Aktivasi procaspase-8 yang dimulai dari pengaktifan procaspase-8 menjadi caspase-8 selanjutnya akan menyebabkan pengaktifan caspase-3 (Pentikäinen, 2002). Berdasarkan hal tersebut diduga penyuntikan testosteron undekanoat dan depot medroksiprogesteron asetat yang menyebabkan azoospermia disebabkan oleh apoptosis melalui aktivasi protein caspase-3. Dengan demikian penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivasi protein caspase-3 pada sel germinal testis setelah penyuntikan TU+DMPA pada tikus, dan menganalisis hubungan aktivasi protein caspase-3 terhadap konsentrasi spermatozoa tikus (*Rattus sp.*) pada beberapa kondisi perlakuan TU+DMPA.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen murni (*true experiment*) dengan rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan beberapa kondisi perlakuan. Hewan percobaan (tikus (*Rattus* sp.) jantan strain Sprague-Dawley dikelompokkan berdasarkan beberapa kondisi perlakuan dalam penelitian, yaitu: K0 (praperlakuan), K1 (penekanan 6 minggu setelah penyuntikan), K2 (penekanan 12 minggu setelah penyuntikan), K3 (penekanan 18 minggu setelah penyuntikan) dan K4 (penekanan 24 minggu setelah penyuntikan). Masing-masing perlakuan disertai dengan kontrolnya. Penyuntikan kombinasi TU+DMPA dilakukan berdasarkan metoda Moelock *et al.*, (2001). TU diberikan pada tiap 6 minggu sekali. Sedangkan DMPA dilakukan setiap 12 minggu. Setelah tikus dibedah, testis dan epididimis diambil dan secara hati-hati dibersihkan dengan garam fisiologis. Kemudian dilakukan penghitungan konsentrasi spermatozoa epididimis dan pembuatan preparat irisan dengan metode paraffin. Dan dilanjutkan dengan Immunostaining caspase-3 dari testis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan sel germinal positif ekspresi caspase-3 kelompok K0 (praperlakuan) dan keempat kelompok perlakuan dengan kombinasi TU+DMPA masing-masing pada K1 (minggu ke-6), K2 (minggu ke-12), K3 (minggu ke-18), K4 (minggu ke-24) dapat dilihat pada diagram berikut:

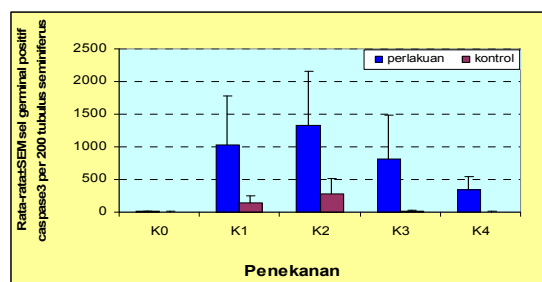
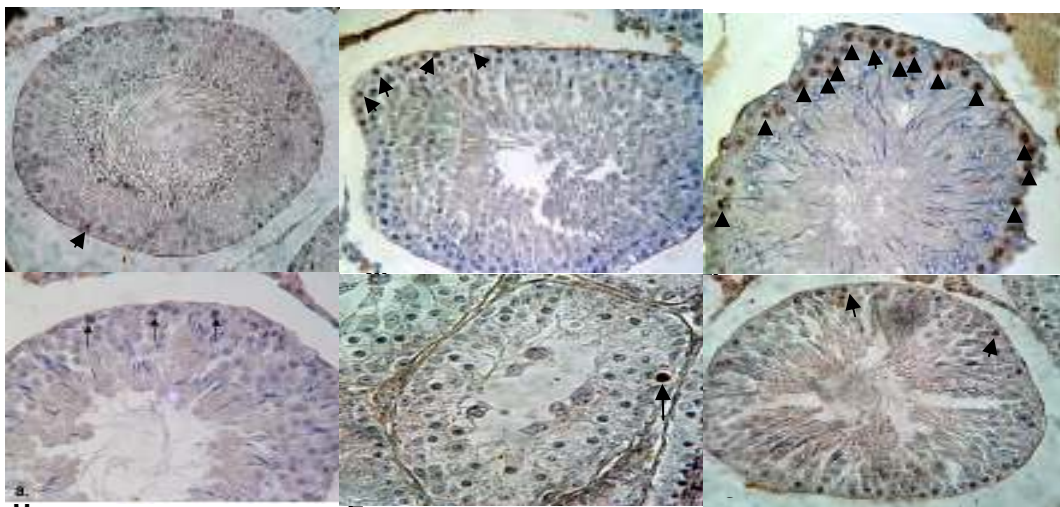


Diagram 1. Jumlah sel germinal yang positif mengaktivasi Caspase-3 pada kelompok perlakuan kombinasi TU+DMPA dan kelompok kontrol (rata-rata±SEM)

Aktivasi protein caspase-3 dihitung berdasarkan jumlah caspase-3 yang ditunjukkan dengan sel germinal yang berwarna kecoklatan dalam tiap tubulus seminiferus. Setelah dilakukan perhitungan jumlah sel germinal positif caspase-3 untuk tiap perlakuan maka diperoleh hasil adanya peningkatan jumlah sel germinal positif caspase-3. Pada kelompok K0 (praperlakuan) hanya terjadi sedikit jumlah sel germinal positif caspase-3. Jumlah sel germinal positif caspase-3 mulai mengalami peningkatan pada K1 (minggu ke-6) dan minggu-minggu selanjutnya. Peningkatan ini terjadi pada tiap perlakuan bila dibandingkan dengan kelompok kontrol dari masing-masing perlakuan. Peningkatan tertinggi terjadi pada K2 diantara semua perlakuan. Namun pada K3 mulai mengalami penurunan jumlah sel germinal positif caspase-3 dan semakin menurun pada K4.

Hasil pewarnaan sel germinal testis tikus untuk tiap kelompok dapat dilihat pada gambar berikut:



Gambar 1. Hasil pulasan aktivasi caspase-3 sel germinal, a. K0 (praperlakuan) b. K1 (penekanan 6 minggu). c. K2 (penekanan 12 minggu) terdapat peningkatan aktivasi caspase-3. d. K3 (penekanan 18 minggu) dan e. K4 (penekanan 24 minggu). f. Kontrol K2. pemeriksaan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 kali (ditunjukkan dengan tanda panah).

Peningkatan aktivasi caspase-3 juga terjadi pada masing-masing kontrol (gambar 1.f). Hal ini sebagai pertanda bahwa apoptosis tetap terjadi dalam keadaan normal untuk mengatur dan menjaga keseimbangan sel germinal testis. Penelitian Kim *et al* (2001), juga menunjukkan terjadinya apoptosis pada kontrol dalam keadaan normal. Print and Loveland (2000), mengungkapkan bahwa untuk mencapai homeostasis yang tepat pada tiap tipe sel germinal. Selama spermatogenesis masa dewasa, apoptosis sel germinal berfungsi mempertahankan jumlah tiap tipe sel secara tepat dan membuang secara selektif sel-sel yang rusak. Penelitian Pentikäinen (2002), menunjukkan bahwa apoptosis sel germinal spontan meliputi tiga kelas sel germinal yakni spermatogonia, spermatisit dan spermatid. Penelitian Kim *et al* (2001), menunjukkan bahwa caspase-3 teraktivasi pada spermatisit dan kandungan protein *caspase-activated deoxyribonuclease* (CAD) meningkat secara signifikan pada sel germinal.

Dari hasil uji non parametrik (Friedman), diperoleh nilai $p=0,231$ ($p>0,05$). Hal ini berarti H_0 diterima atau tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelima kelompok perlakuan yang diuji (praperlakuan, K1, K2, K3 dan K4). Namun untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan antara kelompok perlakuan dengan kontrolnya masing-masing diperoleh hasil bahwa perbedaan bermakna terdapat pada K3 dan K4 dengan kelompoknya masing-masing ($p<0,05$). Dan dari hasil analisis data didapatkan adanya korelasi negatif antara konsentrasi spermatozoa dengan sel germinal positif caspase-3 ($p=0,684$).

KESIMPULAN

Penyuntikan kombinasi TU+DMPA dapat menyebabkan peningkatan aktivasi protein caspase-3 pada sel germinal testis tikus. Terdapat hubungan tidak signifikan antara aktivasi protein caspase-3 pada sel germinal tikus yang mengakibatkan penurunan konsentrasi sperma. Peningkatan aktivasi protein caspase-3 cenderung mengakibatkan penurunan jumlah konsentrasi spermatozoa tikus pada penekanan 12 minggu setelah penyuntikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Ge, Y.F., Huang, Y.F., Zhang, G.Y., Wang, X.H., Xu, Y.P. 1999. Studies on Apoptosis of Spermatogenic Cells in Normal Fertile Men Treated with Supraphysiological Doses of Testosterone Undecanoate. *Asian J Androl* 1: 155-158.
- Hengartner, M.O. 2000. The Biochemistry of Apoptosis. *Nature* 407: 770-784.
- Kim, J.M., Shampa, R.G., Alexander, C.P. and Barry, R.Z. 2001. Caspase-3 and Caspase-Activated Deoxyribonuclease are Associated with Testicular Germ Cell Apoptosis Resulting from Reduced Intratesticular Testosterone. *Endocrinology* Vol.142. No.9 3809-3816.
- Moeloe, N., Pujiyanto, D.A., Agustin, R., Arsyad, K.M., Waluyo, P., Priyugiharta, Y., Bizvo M.T. 2001. *Achieving Azoospermia by Injections of Testosterone Undecanoate Alone or Combined with Depot Medroxyprogesterone Acetate in Indonesian Men (Jakarta Center Study)*. In: Robeire B, Chemes H and Morales CR, eds. Proc 7th International Congress of Andrology. Montreal, Canada. Medimond Publishing Company, Inc. p: 545-550
- Pentikäinen, V. 2002. Regulation of Male Germ Cell Apoptosis-Roles of Sex Steroids And The Cellular Death Receptors Fas And Tnfr1. Academic Dissertation-Helsinki University Biomedical Dissertations No.13. p: 14-19.
- Print, C.G., Loveland, K.L. 2000. Germ Cell Suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 22: 423-430.
- Reed, J. 2000. Mechanisms of Apoptosis. Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. *Am J of Pathology* 157(5): 1415-1430