

Ekspresi Gen Family Bcl-2 dan Ekspresi Gen Protein Kanal Ion Vdac1 pada Oligozoospermia

Arni Amir

Abstrak

Salah satu bentuk infertilitas pada pria adalah jumlah spermatozoa yang kurang dari normal (Oligozoospermia). Berbagai mekanisme diduga berperan dalam terjadinya oligozoospermia, mulai dari faktor fisik, stress, makanan dan molekuler. Penelitian ini merupakan kajian molekuler terhadap pengaruh ekspresi gen Bax, Bcl-2 dan VDAC terhadap terjadinya oligozoospermia. Penelitian dilakukan terhadap 40 sampel oligozoospermia dan sebagai kontrol adalah golongan normozoospermia dengan jumlah yang sama banyak. Sperma diisolasi menggunakan Percoll hypaque. Isolasi RNA menggunakan High Pure RNA isolation kit (Roche). Selanjutnya dilakukan pembuatan cDNA menggunakan First Strand cDNA synthetis (Roche). Tingkat ekspresi gen dinilai menggunakan mesin Light Cycler 2.0 (Roche). Primer didesain menggunakan software primer 3 plus dan spesifikasi primer dianalisis dengan Basic Local Alignment Search Tool (Blast). Tingkat ekspresi dibandingkan menggunakan Housekeeping gene (β -actin). Berdasarkan data penelitian diketahui tingkat ekspresi VDAC dan BAX lebih tinggi pada kelompok oligozoospermia dibanding normo ($p < 0.05$), namun tidak ditemukan perbedaan pada gen Bcl-2 ($p > 0.05$). Berdasarkan proporsi ekspresi ditemukan sebagian besar kelompok oligozoospermia mengalami overekspresi pada gen VDAC dan BAX (90% dan 93.3%), namun tidak ada overekspresi pada normo ($p > 0.05$). Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa overekspresi VDAC dan BAC berkaitan dengan kejadian oligozoospermia

Kata kunci: Oligozoospermia, VDAC, Bax, Bcl-2, ekspresi gen

Abstract

One form of infertility in men is the number of spermatozoa which is less than normal (Oligozoospermia). Various mechanisms though have a role in the occurrence of oligozoospermia, it can be from physical factors, stress, food and molecular. This research is a molecular study of gene expression, Bax, Bcl2 and VDAC influence of the oligozoospermia's occurrence. The research is conducted on 40 samples of oligozoospermia and as a control is normozoospermia class with a lot of number. The sperm are isolated with Percoll hypaque. RNA isolation use High Pure RNA isolation Kit (Roche). Next, conducted the cDNA making by using First Strand cDNA synthetis (Roche). Gene Expression level was rated by using Light Cycler 2.0 machine (Roche). The Primer are designed using software primer 3 plus and primer specification that analyzed with Basic Local Alignment Search Tool (Blast). The expression level was compared by using Housekeeping gene (β -actin). According to the research data known that VDAC and BAX expression level higher in oligozoospermia class than normozoospermia ($p < 0.05$), but did not find any differences in Bcl-2 gene ($p > 0.05$). Based on the proportion of expression was found some oligozoospermia class that encounter over expression in VDAC and BAX gene (90% and 93.3%), but there is no expression in normozoospermia ($p > 0.05$). This research can be concluded that the over expression of VDAC and BAX associated with the incidence of oligozoospermia.

Keywords: Oligozoospermia, VDAC, BAX, Bcl2, and gene expression

Affiliasi penulis : Bagian Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas,

Korespondensi : Arni Amir, email : amir_arni@yahoo.com, Telp: 0811660263

PENDAHULUAN

Infertilitas didefinisikan sebagai ketidakmampuan pasangan suami istri untuk mendapatkan keturunan setelah dua tahun menikah dengan melakukan hubungan seksual secara teratur dan adekuat tanpa adanya upaya mencegah kehamilan. Infertilitas sendiri bukanlah masalah kesehatan yang mengancam kehidupan, tetapi memberikan dampak psikologis yang berat bagi pasangan suami istri dan keluarganya di masyarakat.¹

Salah satu bentuk infertilitas pada pria adalah jumlah spermatozoa yang kurang dari normal. Pasien dengan masalah ini dikategorikan sebagai golongan oligozoospermia, yaitu memiliki jumlah spermatozoa

kurang dari 20 juta/ml atau 40 juta / ejakulat. Konsentrasi semen yang menurun dapat bersamaan dengan kelainan yang bermakna dalam morfologi dan motilitas spermatozoa. Oligozoospermia dapat terjadi karena gangguan proses pembelahan mitosis dan meiosis pada semua tahap spermatogenesis dan atau terjadinya proses apoptosis yang berlebihan selama spermatogenesis. Gen-gen utama yang berperan dalam mekanisme apoptosis antara lain Fas ligand (Fas L), Fas reseptor (Fas R), p-53 dan protein-protein dari keluarga BCL-2, seperti bax, bcl-2, bid, dan lain sebagainya.²

Fungsi utama dari keluarga protein Bcl-2 adalah mengontrol secara langsung permeabilitas membran mitokondria dan akan mengatur pelepasan faktor apoptosis dari ruang antar membrane ke dalam sitoplasma.³ Diketahui bahwa faktor-faktor apoptosis biasa melepaskan bagian dari sitokrom c, Smac Diablo,

Apoptotic Inhibiting Factor (AIF) dan endonuklease G. Smac Diablo dan sitokrom c terlibat dalam aktivasi caspase, Apoptotic Inhibiting Factor (AIF) dan endonuklease G memainkan peran dalam menginduksi caspase independent apoptosis dalam nucleus. Anggota anti apoptosis dari keluarga Bcl-2 menghambat pelepasan dari faktor-faktor apoptosis sedangkan yang anggota keluarga Bcl-2 pro apoptosis merangsang pelepasan faktor-faktor apoptosis.⁴

Membran mitokondria mengandung kanal – kanal ion seperti kanal K^+ yang tergantung ATP (mito K ATP Channel), kanal Ca^{++} (uniporter Ca^{++}), kanal Cl^- , dan lain sebagainya. Pada mitokondria terdapat jalan utama untuk translokasi metabolit-metabolit yang berlokasi hanya yang ada di membrane luar. Kanal ini dikenal sebagai porin atau *Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC).⁵

VDAC dikenal sebagai porin mitokondria, sebuah pori yang merupakan protein atau /kanal ion dengan berat molekul 30 – 35 kDa, yang terdapat pada membran luar mitokondria. Sebagai kanal, porin ini bertanggung jawab atas keluar masuknya metabolit pada mitokondria, termasuk ATP. Porin ini tidak hanya memperantarai transport ATP dari dalam mitokondria tetapi juga mengatur proses keluarnya ATP.⁶

Sampai saat ini pada tikus, mencit, sapi dan manusia telah berhasil diidentifikasi tiga isoform dari VDAC, yang memiliki fungsi khusus pada organisme multi seluler. Ketiga isoform tersebut yaitu VDAC1, VDAC2 dan VDAC3 terekspresi pada berbagai jaringan.⁷ Keberadaan tiga isoform yang berbeda dan bentuk polanya menandakan fungsi khusus diantara ketiga isoform tersebut. Studi elektrofisiologi pada pemurnian protein memperlihatkan kemampuan protein yang berbeda diantara setiap isoform.⁸

VDAC1 berhubungan dengan proses *gating canal* yang tergantung tegangan dan ikatan dengan heksokinase. Penelitian – penelitian yang di lakukan terhadap VDAC membuktikan bahwa VDAC1 merupakan isoform yang paling banyak terdapat di dalam sel dan sangat terkait dengan apoptosis sel. VDAC1 berperan dalam apoptosis dengan menginduksi terbentuknya kompleks *permeability transition pore* (PTP) mitokondria dan pelepasan sitokrom c.⁹ *Permeability Transition Pore* adalah kanal besar yang dibentuk oleh VDAC di membran luar mitokondria, *Adenina Nukleotide Translocator* (ANT) di membran dalam dan cyclophilin D di dalam matriks. Setelah ada stimulus apoptosis maka sitokrom c, faktor-faktor penginduksi apoptosis dan protein-protein procaspase tertentu dilepaskan melalui PTP ini dan dimulai pengaktifan caspase.

Melalui interaksi dengan protein proapoptosis BAX, yang merupakan anggota pro- apoptosis keluarga BCL-2, BAX akan menyelubungi VDAC untuk penahanan VDAC selama apoptosis. Protein pro-apoptosis BAX memegang peranan penting pada sel-sel germinal mencit jantan. Protein BAX berlokalisasi pada sel-sel benih jantan yang sedang mengalami apoptosis selama tahap pertama spermatogenesis. BAX dapat memicu apoptosis spermatogenesis dan spermatosit fisiologis. Testis mencit dewasa yang dihilangkan protein BAX mengandung jumlah

spermatogonia dan spermatosit pre-leptoten yang berlebihan dan tidak terjadi apoptosis selama proses spermatogenesis.¹⁰

Berdasarkan hal – hal tersebut diatas maka dalam penelitian ini akan diungkapkan aspek biologi molekuler penyebab oligozoosperma dengan meneliti kanal ion pada mitokondria yaitu VDAC1, yang mengatur permeabilitas membran luar mitokondria dan apoptosis dan menyebabkan jumlah spermatozoa berkurang. Dengan diketahui penyebab oligozoospermia ini, maka pengobatan oligozoospermia menjadi terarah.

METODE

Subjek teliti

Sampel adalah pria dengan kondisi oligozoospermia (infertil) yang datang ke bagian biologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, untuk memeriksakan analisa sperma yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi dan pria voluntier normozoospermia (fertil). Besar sample ditetapkan 20 orang kelompok oligozoospermia dan sebagai pembandingan ditetapkan 10 kelompok sehat (normozoospermia) secara matching.

Isolasi spermatozoa dengan Percoll

Isolasi spermatozoa dilakukan untuk memisahkan spermatozoa dari cairan semen yang lain. Untuk tujuan tersebut, maka dibuat larutan Percoll 100%, dengan cara mencampurkan Percoll dan 1,5 M NaCl dengan perbandingan 9 : 1. Selanjutnya dibuat larutan Percoll 90% dan 45% dari larutan Percoll 100% dengan cara menambahkan dengan medium Cramer.

Desain Primer dan Probe

Primer dan probe ditujukan terhadap gen BAX, gen BCL2, dan gen VDAC1. Desain primer menggunakan software yang terdapat pada primer 3 plus. Spesifikasi primer dinilai dengan melakukan Blast terhadap primer tersebut.

Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

RNA diekstraksi dari isolat sel spermatozoa yang berasal dari sampel oligozoospermia dan normozoospermia. Isolasi RNA menggunakan High Pure RNA isolation kit (Roche). Pembuatan cDNA menggunakan First Strand cDNA Syntesis Kit (Roche).

Penentuan ekspresi BAX, Bcl2 dan gen VDAC,

Semua gen diamplifikasi dengan LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green kit (Roche) menggunakan mesin Real Time PCR (LightCycler® 2.0-Time PCR System Real, Roche).

Tahapan kerja Real Time PCR terdiri dari 4 langkah, yaitu denaturasi template DNA, Amplifikasi PCR target, Melting Curve dan pendinginan (cooling). Suhu denaturasi ditetapkan pada 95 C, pada tingkat denaturasi awal, denaturasi amplifikasi dan denaturasi melting curve, suhu pendinginan 40 C dan suhu ekstensi 72 C. Suhu Annealing ditetapkan berdasarkan hasil optimasi.

Tabel 1. Tahapan Real Time PCR

Denaturasi awal	95^o C selama 10 menit
Amplifikasi DNA target	
Denaturasi	95 ^o C selama 10 detik
Annealing	optimasi (50 ^o - 55 ^o C) selama 10 detik
Ekstensi	72 ^o C selama 10 detik
Melting Curves	
Denaturasi	95 ^o C selama 0 detik
Annealing	optimasi (60 ^o – 65 ^o C)
Melting	95 ^o C selama 0 detik
Cooling	40 ^o C selama 30 detik

Konsentrasi primer antara 0,2 – 1 µM untuk masing – masing Forward dan reverse sedangkan konsentrasi probe adalah 0,2 – 0,4 µM.

Analisis Data

Hasil yang diperoleh diolah secara statistik, apabila data berdistribusi normal digunakan uji parametrik t test dengan derajat kemaknaan 95%. Untuk mengetahui pengaruh antara masing - masing kelompok perlakuan dengan kontrol.

Untuk melihat hubungan ekspresi antara gen BAX, genBcl-2 dan gen VDAC1 oligozoospermia dengan gen BAX, gen Bcl-2 dan gen VDAC1 normozoospermia digunakan uji Pearson.

HASIL

Karakteristik subjek

Penelitian untuk mengetahui ekspresi gen famili Bcl-2 dan ekspresi gen protein kanal ion VDAC-1 dilakukan pada 40 orang. Pria oligozoospermia yang diberi kode O1- O30 dan 10 orang pria normozoospermia yang diberi kode N1-N10 yang datang kebagian biologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas untuk melakukan pemeriksaan analisis semen dan melalui kerjasama dengan para dokter spesialis obstetri dan gynecologi yang mengirimkan pasien infertile untuk melakukan analisis semen pada klinik Prodia Padang.

Setelah dilakukan analisa sperma terhadap pasien infertile tersebut dengan hasilnya adalah oligozoospermia dan variabel- variabel yang menyertai dan lainnya adalah normal. Data profil analisis semen dari pasien oligozoospermia dan normozoospermia dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 2. Karakteristik dasar oligozoospermia dan normozoospermia

No	Variabel	Normozoospermia (n = 10)	Oligozoospermia (n = 20)
1	Volume	2.8 ± 1.16	2.9 ± 0.67
2	pH	7.8 ± 0.03	7.8 ± 0.02
3	Viskositas	3.8 ± 2.1	3.2 ± 2.12
4	Jumlah sperma (x 10 ⁶)	288 ± 56.3	28.7 ± 15.3
5	Konsentrasi (x10 ⁶ sel/ml)	96 ± 34.2	13.3 ± 5.8
6	Motilitas (%)	58.6 ± 12.4	45.2 ± 8.6

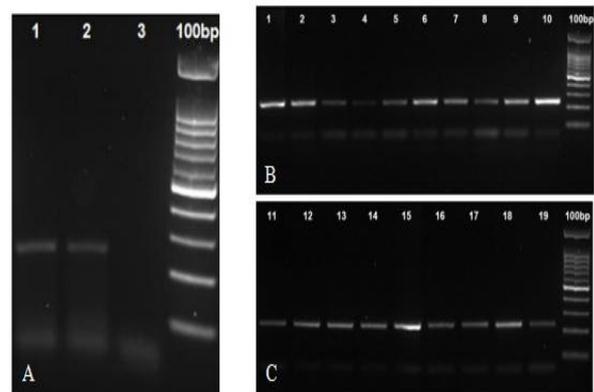
Desain primer dan amplifikasi gen target

Pada penelitian ini, tingkat ekspresi gen ditunjukkan terhadap 3 gen yang diduga berperan dalam terjadinya oligozoospermia, yang terdiri dari Bax, Bcl2 dan Vdac1. Berdasarkan data dari *ensembl Genome Browser* diketahui bahwa Bax terletak pada kromosom 19 pada posisi 49.457.472 - 49.465.655. Gen ini berukuran 8.184 bp, terdiri dari 4 ekson dan 13 varians. Bcl-2 terletak pada kromosom 18, posisi nukleotida 60.790.579 – 60.987.361, berukuran 196.782 bp, terdiri dari 2 ekson dan 5 varian. Sedangkan gen Vdac-1 terletak pada kromosom 5, pada posisi nukleotida ke 133.307.606 - 133.340.824, ukuran 33.219 bp. Gen ini terdiri dari 9 ekson dan 7 varian.

Adanya variasi menyebabkan susunan cDNA ketiga gen juga bervariasi antara satu individu dengan individu lain. Karena primer didesain sendiri, maka diperlukan analisis ketepatan posisi primer melalui amplifikasi cDNA menggunakan primer yang dipilih.

Primer didesain menggunakan kombinasi software primer 3 plus dan amplify. Sekuens primer diaji spesifisitasnya dengan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Hasil analisis memperlihatkan primer spesifik pada transkrip mRNA ketiga gen.

Amplifikasi cDNA menggunakan kit go tag green (Roche, US). Amplifikasi dilakukan dengan komposisi campuran : ddH₂O + primer F + primer R + cDNA + BSO. Siklus PCR terdiri dari denaturasi awal 94^oC, dilanjutkan dengan 30 siklus amplifikasi, masing-masing dengan denaturasi lanjut 94^oC, annealing 64^oC dan ekstensi 72^oC. Siklus PCR diakhir dengan ekstensi akhir pada 72^oC.

**Gambar 1.** Hasil elektroforesis gen Vdac (A, 226 bp), bax dan bcl-2 (B dan C, masing-masing 253 bp).

Desain Primer dan Amplifikasi gen target

Berdasarkan hasil sekuensing terhadap ketiga cDNA gen target didesain probe terhadap masing-masing gen target. Probe didesain menggunakan primer 3 plus dengan beberapa modifikasi sesuai dengan syarat probe yang baik. Probe yang didapat dilabel dengan reporter pada ujung 5' dan quencer pada ujung 3'. Reporter yang digunakan pada penelitian ini adalah FAM, sedangkan quencer adalah TAMRA. Spesifisitas primer dianalisis dengan BLAST. Untuk mengetahui tingkat ekspresi gen digunakan primer dan probe spesifik untuk housekeeping gen. Pada penelitian ini digunakan.

Tabel 3. List Sekuens Probe gen Bax, Bcl-2, Vdac-1

No	Gen	Sekuens olinukloetida
1	Bcl-2	FAM – 5' TCCTCTGTGATGCTGAAAGG 3' - TAMRA
2	Bax	FAM – 5' AGGGGTCTGGATGCACATAG 3' – TAMRA
3	Vdac-1	FAM – 5' CGTGC AAGCTGATCT TCCACA 3' – TAMRA
4	GAPDH	F : 5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3' R : 5'-GAAGATGGTGTGATGGGATTC-3' Probe : FAM -CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC-TAMRA
5	β -actin	F : 5'-ACCGAG CGCGGCTAC AG R : 5'-CTTAATGTC ACGCAGCATTC C Probe : FAM – TTCACCACCACGGCCGAGC - TAMRA

Tingkat Ekspresi gen

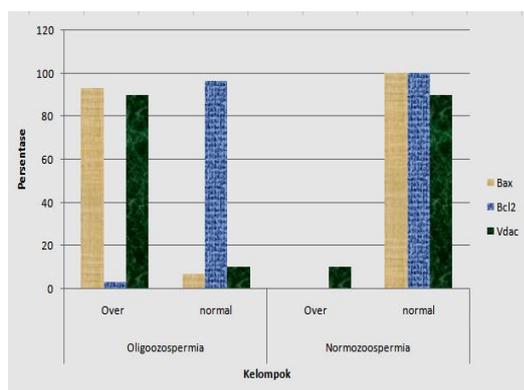
Ekspresi gen dianalisis dengan membandingkan nilai Ct gen target dengan housekeeping gen sedangkan data kuantitatif didasarkan jumlah kopi (Copy number) gen yang didapatkan dari perhitungan menggunakan kurva standart.

Pada penelitian ini rerata kopi number gen Bax adalah 6.5×10^9 pada kelompok oligozoospermia sedangkan pada kelompok normozoospermia hanya 1.1×10^9 . Analisis dengan independent t test memperlihatkan perbedaan yang bermakna ($p < 0.05$). Analisis data kualitatif memperlihatkan pola yang sama dimana ekspresi bax lebih banyak pada kelompok oligozoospermia (85% vs 13.5%, $p < 0.05$).

Analisis terhadap VDAC memperlihatkan rerata kopi number VDAC adalah lebih tinggi pada kelompok oligozoospermia, yaitu 3.7×10^9 , sedangkan kelompok normozoospermia adalah 9.5×10^8 . Secara statistik hasil ini berbeda secara bermakna ($p < 0.05$). Hasil yang berbeda ditemukan pada Bcl-2 dimana tidak terdapat perbedaan jumlah kopi Bcl-2 pada kedua kelompok.

Tabel 4. Jumlah kopi gen VDAC, BAC dan Bcl-2 pada kelompok oligozoospermia dan normozoospermia

No	Gen	Rerata jumlah kopi ($\times 10^9$)		p
		Normozoospermia	Oligozoospermia	
1	BAX	1.1 ± 0.12	6.5 ± 0.51	0.005
2	VDAC1	0.95 ± 0.17	3.7 ± 0.24	0.013
3	Bcl-2	0.88 ± 0.12	0.86 ± 0.21	0.924

**Gambar 2.** Proporsi overekspresi dari gen Bcl-2, BAX dan VDAC pada kelompok oligozoospermia dan normozoospermia

PEMBAHASAN

Apoptosis sering digunakan untuk kematian sel yang terprogram. Istilah ini pertamakali

dikemukakan oleh Kerr pada tahun 1972 yang dengan penamaan Yunani disebut juga Falling off. Di dalam pengertian yang sempit, apoptosis digunakan untuk bentuk kematian sel yang membutuhkan keberadaan gen tanpa memenuhi beberapa atau seluruhnya kriteria morfologi apoptosis. Gen-gen utama yang berperan dalam mekanisme apoptosis antara lain Fas ligand (Fas L), Fas reseptor (Fas R), p-53 dan protein-protein dari keluarga BCL-2, seperti bax, bcl-2, bid, dan lain sebagainya.¹¹

Penelitian ini didasarkan pada asumsi bahwa oligozoospermia berkaitan dengan peningkatan apoptosis pada sel sperma. Gen yang berperan dalam mekanisme ini adalah VDAC dan BAX. VDAC berperan dalam peningkatan permeabilitas membran sedangkan BAX menginduksi apoptosis.

Hasil penelitian memperlihatkan gambaran yang bersesuaian dengan hipotesis awal dimana terdapat peningkatan kopi number VDAC dan BAX pada kelompok oligozoospermia. Rerata kopi number gen Bax adalah 6.5×10^9 pada kelompok oligozoospermia sedangkan pada kelompok normozoospermia hanya 1.1×10^9 ($p < 0.05$). Analisis data kualitatif memperlihatkan pola yang sama dimana ekspresi BAX lebih banyak pada kelompok oligozoospermia (93.3% vs 6.7%, $p < 0.05$).

Analisis terhadap VDAC memperlihatkan rerata kopi number VDAC adalah lebih tinggi pada kelompok oligozoospermia, yaitu 3.7×10^9 , sedangkan kelompok normozoospermia adalah 9.5×10^8 . Secara statistik hasil ini berbeda secara bermakna ($p < 0.05$). Hasil yang berbeda ditemukan pada Bcl-2 dimana tidak terdapat perbedaan jumlah kopi Bcl-2 pada kedua kelompok.

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan terdapat peningkatan ekspresi gen BAX dan VDAC-1 pada kelompok oligozoospermia dan tidak terdapat perbedaan ekspresi gen Bcl-2 pada oligo dan normozoospermia

DAFTAR PUSTAKA

- Irsan SM. Analisis ekson 5 gen voltage dependent anion channel isoform 3 (VDAC 3) dan ekspresinya pada sperma pria infertil astenoospermia (disertasi). Jakarta: Program Pasca Sarjana Universitas Indonesia; 2009.
- Young KA, Nelson RJ. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis, Reproduction. 2001;(122):677-85.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nature Rev. 2001;(2):67-71.
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR; The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. Nat Cell Biol. 2000;(2): 156-62.
- Colombini M. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. Dalam: Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff, et al. Molecular Biology Of The Cell. Edisi ke-4. New York: Garland Science, 2004. hlm.92, 966-7, 1146-67.
- Rostovtseva T, Colombini M. ATP flux is controlled by voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. J Biol chem, 2004; 271: 28006-8.

7. Huizing M, Ruitenbeek W, Thinnes FP, *et al.* Deficiency of the voltage-dependent anion channel: a novel cause of mitochondriopathy. *Pediatr Res.* 1996; 39: 760- 5.
8. Bianjiang Liu, Peng Wang, Zengjun Wang*, Wei Zhang*. Biochemical and biophysical research communications, 2001, 2010-06-10.
9. Zalk R, Israelson A, Gart ES, Oligomeric states of the voltage-dependent anion channel and cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J.* 2005; (386): 73-83.
10. Print CG, Loveland KL; Germ cell suicide new insights in to apoptosis during spermatogenesis. *Bioessay.* 2000; (22): 423-29.
11. Young KA, Nelson RJ; Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis, *Reproduction.* 2001; (122): 677-85.