

Kerusakan DNA Spermatozoa Pada Semen Pria Infertil Yang Terinfeksi *Escherichia Coli*

Sukarjati

Dosen Program Studi Biologi, FMIPA Univ. PGRI Adi Buana Surabaya

ABSTRAK

Escherichia coli merupakan penyebab utama infeksi traktus genitalis pria meliputi epididimitis, prostatitis dan orchitis yang bersifat asimtomatis. Infeksi traktus genitalis dapat menyebabkan infiltrasi lekosit ke saluran reproduksi yang menyebabkan kadar *Reactive Oxygen Species* (ROS) tinggi. ROS mengoksidasi DNA dengan indikator terbentuknya 8-OHdG. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis kadar 8-OH-dG pada semen pria infertil yang terinfeksi *Escherichia coli*. Sampel penelitian adalah 40 semen pria infertil. Semen dibagi menjadi 3 bagian. Masing-masing bagian digunakan untuk identifikasi bakteri, analisis semen dan penentuan kadar 8-OH-dG. Identifikasi bakteri dikerjakan dengan teknik kultur standart bakteriologi, analisis spermatozoa dilakukan secara konvensional menurut kriteria WHO, penentuan kadar 8OHdG menggunakan metode HPLC.

Hasil analisis spermatozoa adalah 5 sampel normospermia, 1 sampel astenospermia, 11 sampel teratospermia, 8 sampel astenoteratospermia, 6 sampel oligoteratospermia, 9 sampel oligoastenoteratospermia. Hasil kultur didapat bahwa 18 sampel steril, semen terinfeksi *Escherichia coli* sejumlah 4 sampel, *enterobacter aerogenes*: 5 sampel; *Streptococcus faecalis*: 4 sampel; *Pseudomonas*: 3 sampel; *Staphylococcus epidermidis*: 6 sampel. Kadar 8OHdG pada semen yang terinfeksi *Escherichia coli* lebih tinggi daripada normospermia. Dari penelitian ini dapat disimpulkan infeksi traktus genitalis oleh *Escherichia coli* secara tidak langsung dapat menginduksi kerusakan DNA spermatozoa dengan indikator terbentuknya 8OHdG.

Kata kunci : DNA, , infertile, *Escherichia coli*, 8OHdG.

PENDAHULUAN

Sejumlah penyebab infertilitas pria telah diidentifikasi yaitu mutasi gen, aneuploid, varikokel, radiasi, kemoterapi, erektile disfungsi, oklusi duktus ejakulatorius, dan infeksi (Ollero *et al.*, 2001). Menurut Khanna *et al.* (1992), infeksi traktus genitalis pria merupakan penyebab infertilitas sebesar 10 %. Infeksi traktus genitalis tersebut terutama epididimitis, orkhitis atau prostatitis merupakan faktor penyebab yang penting pada infertilitas pria (Sikka *et al.*, 2001). *Escherichia coli* merupakan penyebab utama

prostatitis dan epididimitis (Liu *et al.*, 2002). Infeksi traktus genitalis juga dapat merusak *blood testis barrier* yang mengakibatkan kebocoran lekosit dalam tubulus seminiferus atau epididimis (Alvarez *et al.*, 2002). Lekosit ada di testis pada saat terjadi sirkulasi monosit mencapai gonad selama kehidupan fetus.

Bertambahnya konsentrasi lekosit dalam semen merupakan indikator infeksi traktus genitalis (Alvarez *et al.*, 2002). Insiden lekositospermia berkisar 10 – 20 % pada pria infertil. *Polymorphonuclear neutrophil* (PMN) dan makrofag adalah komponen utama lekosit

seminal plasma (Agarwal *et al.*, 2002).

Lekosit yang aktif dapat menghasilkan 100 kali lebih tinggi ROS dibandingkan lekosit yang tidak aktif. Lekosit menjadi aktif karena merespon berbagai stimuli, meliputi infeksi dan inflamasi (Agarwal *et al.*, 2003).

ROS mempunyai sifat sebagai oksidator, spermatozoa merupakan sel yang amat peka terhadap oksidasi. Umumnya sel dilindungi dari kerusakan oksidatif oleh adanya antioksidan dalam sitoplasma. Tetapi pada spermatozoa, sitoplasmanya sangat sedikit (20 mm³). Dan sitoplasma tersebut tidak terdistribusi menyebar tetapi terlokasi dalam *mid piece* spermatozoa. Akibatnya spermatozoa mengandalkan perlindungan antioksidan yang ada pada seminal plasma (Ochsendorf *et al.*, 1998).

Sasaran ROS adalah lipid, protein dan *Deoxyribo nucleic acid* (DNA) (Sulaiman *et al.*, 1996). Produk kerusakan DNA karena oksidasi meliputi 5-OH-2 sitosin, 2-OH-2 deoksiadenosin, 5 formildeoksiuridin. Tetapi 8-OH-deoksiguanosin (8OHdG) adalah sebagai marker kerusakan DNA karena oksidasi, sebab guanin merupakan basa inti yang rawan terhadap oksidasi, tidak dipengaruhi diet, dan diekskresikan ke urine secara terpisah dari proses metabolik lain (Moon, 2001). DNA spermatozoa terdapat di inti dan mitokondria. Kerusakan DNA mitokondria 10-20 kali lebih besar dari pada kerusakan DNA inti karena DNA mitokondria tidak mempunyai histon (Ng MCY *et al.*, 2000). Walaupun demikian kerusakan DNA inti harus tetap menjadi perhatian, mengingat kerusakan DNA inti berdampak pada keturunannya.

Spesies bakteri yang menginfeksi traktus genitalis pria dapat digolongkan menjadi bakteri patogen dan non patogen. Bakteri patogen dan non patogen mempunyai kemampuan yang berbeda. Diantara bakteri

patogen, derajat patogenitasnya juga berbeda. Hal ini disebabkan toksigenitas, daya invasi dan adhesivitas masing-masing spesies bakteri juga berbeda. Menurut Michelman (1998) spesies bakteri yang berbeda dan jumlah bakteri yang berbeda akan menghasilkan spektrum patologis yang berbeda.

Hasil penelitian yang telah dilakukan dengan menggunakan 4 spesies bakteri yaitu *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Enterobacter aerogenes* dan *Escherichia coli* yang dikontaminasikan dengan spermatozoa manusia secara *in vitro* di dapatkan hasil bahwa *Staphylococcus epidermidis* dan *Streptococcus faecalis* tidak berpengaruh terhadap kualitas spermatozoa, sedangkan *Enterobacter aerogenes* dan *Escherichia coli* berpengaruh terhadap motilitas, dan dapat menyebabkan aglutinasi spermatozoa (Sukarjati dkk., 2002). Disamping itu *Enterobacter aerogenes* dan *Escherichia coli* berpengaruh terhadap vitalitas spermatozoa (Sukarjati dkk., 2001). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah semen yang terinfeksi *Escherichia coli* dapat menginduksi terjadinya kerusakan DNA spermatozoa dengan indikator terbentuknya 8 hydroxy deoxyguanosin (8 OHdG).

METODE PENELITIAN

Sampel penelitian

40 semen pria infertil

Prosedur Pengumpulan Data

Untuk mendapatkan data dalam penelitian ini dilakukan langkah-langkah sebagai berikut :

Pengumpulan semen pria infertil.

Semen diperoleh dengan cara masturbasi dan ditampung ke dalam botol kaca atau plastik steril yang bermulut lebar. Semen diambil setelah abstinencia sedikitnya 48 jam dan tidak lebih lama dari 7 hari. Sebelum

mengeluarkan ejakulat, pria tersebut dianjurkan untuk mengeluarkan air seninya terlebih dahulu kemudian mencuci tangan dan penisnya sebelum ejakulat ditampung dalam botol steril.

Pengamatan.

Semen yang diperoleh setelah terjadi liquifaksi dibagi 3 bagian (A,B,C) Masing-masing bagian digunakan untuk pengamatan sebagai berikut :

A : dikerjakan kultur bakteri untuk identifikasi bakteri

B : analisa kualitas spermatozoa.

C : pengamatan kerusakan DNA dengan indikator pengukuran kadar 8OHdG.

Identifikasi Bakteri.

Satu tetes semen (1/20 ml) diratakan dengan ose pada agar darah, kemudian di inkubasi pada 37 derajat C selama 24 jam. Setelah itu biakan dipindah pada medium nutrient agar dan di inkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam dilakukan pewarnaan gram. Selanjutnya dilakukan uji fisiologi atau biokimia , meliputi katalase, indol, MR, VP, sitrat, H₂S, Urea, lisin. Motilitas, produk asam dan gas pada : glucose, maltose, manose, lactose. *Escherichia coli* sifat-sifat yang dimiliki adalah Indol (+), MR(+), VP(-), Sitrat (-), H₂S(-), Urea(-), Lisin (+), Motilitas(+), Produk asam dan gas pada glukosa (+), Laktosa (+) Maltosa (+) Mannosa (+).

Analisis spermatozoa.

Pengamatan konsentrasi , motilitas dan morfologi spermatozoa dikerjakan sesuai dengan standar WHO (1999).

Pengamatan motilitas

Semen setelah liquifaksi diambil satu tetes pada object glass lalu ditutup cover glass dan diamati dibawah mikroskop dengan

perbesaran 400 kali. Motilitas ditentukan dengan kategori menurut WHO (1999) yaitu a. gerakan cepat maju lurus ke depan. b. gerakan lambat ke depan c. tidak bergerak maju atau bergerak di tempat d. tidak bergerak.

Pengamatan konsentrasi

Spermatozoa dihitung dengan cara menggunakan kamar hitung dari Makler. Semen di teteskan pada kamar hitung dan spermatozoa yang tampak pada kotak dihitung untuk dikonversikan ke dalam konsentrasi juta/ml.

Pengamatan morfologi spermatozoa

Dimaksudkan untuk menghitung morfologi spermatozoa normal dan abnormal. Dilakukan dengan pengecatan kristal violet dan safranin. Diamatai 100 spermatozoa. Dibedakan antara bentuk spermatozoa normal dan abnormal (Abnormal kepala, ekor dan tengah).

Pengukuran kadar 8OHdG

Isolasi DNA.

Isolasi DNA inti spermatozoa dilakukan dengan menggunakan " Wizard" Genomic DNA Purification Kit (Promega No Katalog A1120) dengan langkah sebagai berikut ; 300 ml sperma ditambah 900 ml *cell lysis solution*, dicampur dengan cara inversi, diinkubasi 10 menit dan dicentrifuge 16.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dibuang , pellet divortex. Pelet ditambah 300 ml *Nuclei lysis solution*, dan dicampur dengan cara inversi. Kemudian ditambah 100 ml *protein precipitation solution*, vortex 20 detik, dan dicentrifuge 16.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dipindah ke Tube baru yang berisi 300 ml isopropanol, dan dicampur, lalu dicentrifuge 16.000 rpm selama 3 menit. Supernatan dibuang dan ditambah 300 ml ethanol 70 %. Kemudian dicentrifuge 16.000 rpm selama 3 menit. Etanol dibuang pellet dikeringkan diudara selama 15 menit.

Kemudian ditambah *DNA Rehydration solution* dan disimpan semalam pada suhu 4 derajat Celcius.

Penghitungan kadar DNA menggunakan spektrofotometer.

Penentuan kadar 8OHdG

DNA hasil isolasi difragmentasi dengan cara menambahkan 200 ml Natrium asetat 20mM (pH 4,8). Larutan kemudian didigesti dengan menambahkan 20 mg nuclease P1 dan diinkubasi pada 37 derajat Celcius selama 30 menit. Setelah inkubasi tersebut ditambahkan 20 ml Tris HCl 1M (pH 7,4) dan 1,3 unit Alkaline fosfatase serta diinkubasi lagi pada 37 derajat Celcius selama 60 menit. Selanjutnya DNA hasil fragmentasi diamati dengan metode HPLC (Cahill *et al.*, 1997)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis kualitas spermatozoa.

Normospermia sejumlah 5 sampel, Astenospermia 1 sampel, Teratospermia 11 sampel, AstenoTeratospermia sejumlah 8 sampel, Oligo Teratospermia 6 sampel, dan OligoAstenoTeratospermia sejumlah 10 sampel.

Hasil kultur semen.

Semen steril sejumlah 18 sampel, semen terkontaminasi bakteri sejumlah 22 sampel. Kontaminan tersebut adalah *Escherichia coli* sejumlah 4 sampel, *Enterobacter aerogenes* 5 sampel, *Streptococcus faecalis* 4 sampel, *Pseudomonas* 3 sampel, *Staphylococcus epidermidis* 6 sampel.

Tabel 1. Data kadar DNA dan kadar 8OHdG spermatozoa antara semen terkontaminasi *Escherichia coli* dan semen steril yang normospermia

Kualitas Sperma	Bakteri pencemar	Kadar DNA (ng)	Kadar 8OHdG(pg/ng) DNA
Normospermia	Steril	630	0,145092
Normospermia	Steril	616	0,147779
Normospermia	Steril	455	0,071345
Normospermia	Steril	588	0,143649
Normospermia	Steril	882	0,095263
Astenospermia	<i>E. coli</i>	525	0,172007
Astenoteratospermia	<i>E. coli</i>	539	0,162916
Astenoteratospermia	<i>E. coli</i>	406	0,311610
Astenoteratospermia	<i>E. coli</i>	497	0,219903

Analisis data

Data kadar 8OHdG spermatozoa pada semen normospermia, steril dan semen yang terkontaminasi *Escherichia coli* analisis dengan uji t dengan bantuan SPSS. Hasil analisis tersebut adalah ada perbedaan kadar 8OHdG antara semen normospermia dan semen yang terkontaminasi *Escherichia coli* ($0,21 \pm 0,530$ vs $0,6612 \pm 0,860$, $p=0,820$).

Pembahasan

Dari hasil analisis data didapatkadar 8OHdG spermatozoa pada semen yang terkontaminasi *Escherichia coli* lebih tinggi dibandingkan kadar 8OHdG spermatozoa pada semen normospermia yang steril. Infeksi traktus genitalis, misalnya oleh *Escherichia coli* dapat menyebabkan obstruksi atau lesi non destruktif pada duktus eksretori dan lesi pada kelenjar seks aksesori (Auroux et al., 1991), dapat juga merusak *blood testis barrier* mengakibatkan kebocoran lekosit dalam tubulus seminiferus atau epididimis (Alvarez et al., 2002). Lekosit yang aktif karena merespon infeksi atau inflamasi tersebut merupakan penghasil ROS yang tinggi (Agarwal et al.,). Bakteri yang menginfeksi traktus genitalis juga memberikan kontribusi terhadap kadar ROS. Studi pada *Escherichia coli* bahwa enzim sitosol dapat menghasilkan O_2^- , tetapi proporsi terbesar datang dari rantai transport electron (Halliwell dan Gutteridge, 1991). ROS bersifat sebagai oksidator. Sasaran ROS lipid, protein, DNA (Sulaiman, et al., 1991). 8OHdG adalah sebagai marker kerusakan DNA karena oksidasi, sebab guanin merupakan basa inti yang rawan terhadap oksidasi, tidak dipengaruhi diet, dan diekskresikan ke urine secara terpisah dari proses metabolik lain (Moon, 1992).

Pada penelitian ini didapatkan bahwa pada spermatozoa normal (Normospermia) pria

infertil ternyata juga terukur 8OHdG sebagai indikator kerusakan DNA spermatozoa. Hasil penelitian Saleh et al., (2002) bahwa pria infertil yang mempunyai spermatozoa normal dengan menggunakan metode SCSA (*Sperm Chromatin Structure Assay*) didapatkan terjadi kerusakan DNA. Zini (2001) melaporkan bahwa terjadi hubungan yang kuat antara denaturasi DNA dan fragmentasi DNA, dan tingkat kerusakan DNA terjadi lebih tinggi pada pria infertil dari pada pria fertil. Hal ini menunjukkan bahwa infertilitas pria berhubungan dengan jeleknya integritas DNA spermatozoa.

Hasil penelitian Ollero et al., (2001) di dapat bahwa ditemukan kerusakan DNA pada spermatozoa matur. Diajukan 3 hipotesis untuk menjelaskan hal ini yaitu (i) spermiogenesis yang defek menyebabkan bertambahnya spermatozoa immature yang menghasilkan ROS dan merusak DNA spermatozoa, karenanya kerusakan DNA terjadi sebelum spermiasi. (ii) kerusakan DNA terjadi setelah spermiasi (iii) kombinasi dari keduanya.

Masing-masing hipotesis tersebut dapat dijelaskan sebagai berikut: pada hipotesis pertama: kerusakan DNA spermatozoa menunjukkan terjadinya apoptososis selama spermatogenesis. Rusaknya DNA spermatozoa ini mungkin juga karena tidak sempurnanya atau rusaknya pemaketan kromatin spermatozoa selama spermiogenesis. Pada hipotesis 2: spermatozoa matur dan immature menghasilkan ROS dengan atau tanpa penyimpangan sitoplasma. Spermatozoa ini selama migrasi dari tubulus seminiferus ke epididimis dapat menghasilkan kerusakan oksidatif DNA pada spermatozoa matur.

Selanjutnya kerusakan DNA pada spermatozoa yang secara morfologi normal mungkin terjadi sebelum atau selama spermatozoa transit melalui epididimis di mana kondensasi kromatin terjadi. Pada

hipotesis 3: bahwa perubahan dalam regulasi spermiogenesis (yang menyebabkan pemaketan kromatin defek) dan menginduksi ROS merusak spermatozoa matur setelah spermiasi.

Menurut Fraga et al., (1991) kerusakan oksidatif DNA tidak selalu berhubungan dengan menurunnya viabilitas maupun motilitas spermatozoa. Jadi spermatozoa yang mengalami mutasi yang muncul selama spermatogenesis dapat secara efektif mencapai ovum. Enzim perbaikan DNA yang berasal dari ova tidak sempurna memperbaiki kerusakan ini. Basa yang rusak yang tidak diperbaiki selama fertilisasi dapat menyebabkan mutasi pada sel yang membelah selama embryogenesis.

Dengan demikian evaluasi klinik yang meliputi motilitas, morfologi, konsentasi, viabilitas, pH, tidak menggambarkan integritas genom pria yang terdapat dalam kepala spermatozoa (Sakkas dan Tomlinson, 2000).

KESIMPULAN

Penelitian ini dapat memberikan kesimpulan bahwa infeksi traktus genitalis oleh *Escherichia coli* secara tidak langsung dapat menginduksi kerusakan DNA spermatozoa dengan indikator terbentuknya 8OHdG.

DAFTAR PUSTAKA

- Alvarez JG., Sharma RK., Ollero M., Saleh RA., Lopez MC., Thomas AJ., Evenson DP., Agarwal A., 2002, *Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatine structure assay*, Fertil Steril, 78 : 319-329.
- Auroux MR., Jacquest, L., Mathieu D., Aurer J., 1991, *Is The Sperm Bacterial ratio a Determining Factor in Impairment of Sperm Motility; An In Vitro Study in Man With Escherichia coli*, Int. of Andrology, 14;264-270
- Agarwal, A., Thomas AJ., 2002, *Leucocytospermia and male infertility, What is New?*, <http://www.TheReproResearch.html>.
- Agarwal A., Saleh RA., Bedaiwy MA., 2003, *Role of Reactive Oxygen Species in The pathophysiology of Human Reproduction*, Fertil Steril, 79: 829-843
- Cahil A., Wang X, Hoek CB, 1997, *Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption*, Biochem. and Biophys. Res. Comm, 235: 286-290.
- Fraga, CG., Motchnic PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA. And Ames BN, 1991, *Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm*, Proc Natl Acad Sci USA 88;11003- 11006
- Halliwell B. and Gutteridge JMC., 1999, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, Oxford University Press, page 32.
- Khanna J., Van Look PFA, Griffin PD., 1992, *A Key to brighter future*, Geneva, World Health Organization.
- Liu, Jh., Li HY., Cao SG., Duan YF., Li Y., 2002, *Influence of Several Urophatogenic Microorganism on Human Sperm Motility in Vitro*, Asian J. Androl, 4: 179-182.
- Michemmann HW., 1998, *Influence of Bacteria and Leucocyte on The Out Come In Vitro Fertilization (IVF) or Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)*, Andrologia, 30 (1): 99-101.
- Moon, HE-KIM, Hae-Ran Moon, Sung Hyun Hong, 2001, *Determination of urinary 8 Hydroxy 2 deoxyguanosin as a DNA*

- damage marker, cilinical note, html
 Ng, MCY, So WY, SC Lee, T Sanke, HK Lee,
 JCN Chan, 2000, *Genetics of type 2 diabetes mellitus*, HKMJ, 6 : 169-76.
- Ochsendorf,FR., 1998, *Infection and Reactive Oxygen Species*, *Andrologia*,30(1): 81-86.
- Ollero M., Guzman EG, Lopez MC., Sharma RK., Argarwal, A., Larson K., Evenson D., Thomas Jr,AJ., Alvarez, JG., 2001, *Characterization of subset of human spermatozoa at different stages of maturation : Implications in the diagnosis and treatment of male infertility*, *Human Reproduction* ,16(9):1912 –1921.
- Saleh, RA., Agarwal A., Nelson DR., Nada EA., El Tonsy MH., Alvarez JG., Thomas AJ., Sharma RK., 2002, *Increase sperm nuclear DNA damage in normospermic infertile men : a prospective study*, *Fertil Steril*, 78 : 313-318.
- Sakkas, D., and Tomlinson, M., 2000 , *Assessment of sperm competence*, *Semin, Med.*, 18: 133-139
- Sikka SC., Champion HC., Bivalacqua TJ., Estrada LS., Wang, R., Rajasekaran M., Aggarwal BT., and Hellstrom WJG., 2001, *Role of genitourinary inflammation in infertility: synergistic effect of lipopolysaccharide and interferon g on human spermatozoa*, *Int.J. of Andrology*,24:136-141.
- Suleiman SA.,Ali M., Zaki ZMS, El Malik, EMA., and Nasr MA., 1996, *Lipid Peroxidation and Human Sperm Motility : protective role of Vitamin E*, *J.Andrology*,17(5): 530-537.
- Sukarjati, Lunardi,H., Hinting, A., 2002, *Pengaruh Spesies Bakteri dan ratio spermatozoa/ Bakteri terhadap Motilitas spermatozoa Mamusia secara In vitro*, *Berkala Penelitian hayati*, 8 ; 21-25
- Sukarjati, Lunardhi H, 2001, *Pengaruh Spesies Bakteri dan ratio spermatozoa/ Bakteri terhadap Motilitas spermatozoa Manusia secara In vitro*, *Berkala Penelitian Hayati*,7: 41-46.
- Zini A., Bielecki R., Phang D., Zenzes MT., 2001, *Correlation between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men*, *Fertil Steril*, 75: 674-677.