

8-HIDROKSI-DEOKSIGUANOSIN SEBAGAI SALAH SATU INDIKATOR INFERTILITAS PRIA

Sudjarwo

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

ABSTRACT

DNA in human's sperm is located in nucleus (nDNA) and mitochondria (mtDNA). DNA oxidation is indicated from high concentration of 8-OH-dG. It is very important to identify factors that can cause genetic dysfunction risk responsible for genetic changes. 8-OH-dG compound are a promutagenic of DNA dysfunction of deoxyguanosine oxidation by oxygen radical. ROS is an oxidation, which in high concentration can oxidize DNA. Guanine is a nucleotide, which prone to oxidation, with 8-OH-dG as the end product. Detection of 8-OH-dG can be done by HPLC method. These results indicated that there were significant differences ($p < 0.01$) in detection of 8-OH-dG in sperm, between normospermia with asthenospermia and normospermia with oligospermia. Correlation (r) of 8-OH-dG with motile spermatozoa is -0.7111 . Immotile spermatozoa caused by oxidation or DNA damage are shown by high concentration of 8-OH-dG. In normal physical condition, sperm produces oxidant. High oxidant is toxic to sperm, which influence their motility. Sperm's motility is one of factors causing male infertility.

Key words: 8-hydroxydeoxyguanosine, sperm motility, male infertility

PENGANTAR

Asam deoksiribonukleat (*Deoxyribonucleic Acid*, DNA) adalah suatu senyawa pembawa sifat, yang terdapat di inti (nDNA) dan mitokondria (mtDNA). DNA disusun oleh nukleotida adenin (A), guanin (G), timin (T) dan sitosin (C) (Lehninger, 1982). Pada proses fertilisasi nDNA, akan terjadi peleburan dengan sel telur. Adanya kelainan pada nDNA dapat diwariskan pada keturunannya. Sedangkan mitokondria adalah tempat terjadinya respirasi sel, melalui reaksi enzimatik fosforilasi oksidasi (*Oxidative Phosphorylation*, OXPHOS) menghasilkan energi dalam bentuk ATP (*Adenosine Triphosphate*). Pada respirasi tersebut oksigen yang diperlukan tubuh, sekitar 90% dikonsumsi mitokondria dan sekitar 1–2% diubah menjadi radikal superoksid anion. Gangguan rantai respirasi sel di samping menurunkan produksi energi juga mengakibatkan meningkatnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) termasuk radikal bebas yang bersifat oksidator. Selain di mitokondria, inti juga menghasilkan ROS, antara lain oksida nitrit (Sohal and Brunk, 1992; Cahill *et al.*, 1997; Richter, 1992).

Sasaran oksidasi ROS adalah lipid, protein dan DNA (Sies and Menck, 1992). Pada oksidasi DNA, nukleotida guanin adalah nukleotida yang rawan terhadap oksidasi ROS. Hasil oksidasi guanin adalah 8-hidroksi-

deoksiganosin (8-OH-dG). Dengan teroksidasinya guanin pada untai DNA, maka untai DNA akan kehilangan nukleotida guanin. Jumlah hilangnya guanin tergantung kadar ROS, hal ini menyebabkan keadaan yang disebut mutasi DNA. Akibatnya dapat menyebabkan kerusakan mtDNA dan nDNA (Ozawa, 1995). Kerusakan pada nDNA akan mengganggu proses pembelahan sel pada spermatogenesis, dan pada mitokondria mengganggu rantai respirasi sel yang dapat menurunkan energi sel (Sohal and Brunk, 1992).

Energi yang dihasilkan pada respirasi sel melalui reaksi enzimatik oksidasi fosforilasi pada spermatozoa digunakan untuk mempertahankan fungsinya, salah satunya adalah motilitas. Apabila terjadi penurunan energi karena pengaruh oksidasi pada rantai respirasi, maka mengakibatkan menurunnya motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa yang rendah merupakan salah satu faktor penyebab infertilitas pria (Ruiz-Pesini *et al.*, 1998).

Pada penelitian ini dilakukan penentuan konsentrasi 8-OH-dG di dalam sperma manusia, yang dapat merupakan salah satu indikator infertilitas pria. Selain itu penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian "*Validasi metode HPLC pada penentuan kadar 8-hidroksi-deoksiganosin di dalam sperma*" (Sudjarwo, 2002).

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel

Sampel sperma diperoleh secara acak dari donor sperma yang datang rutin untuk kontrol kualitas sperma yang mempunyai permasalahan dengan keinginan untuk memperoleh keturunan pada Poli Infertilitas Rumah Sakit Budi Mulia, Surabaya.

Bahan dan Alat

Semua bahan kimia yang dipakai mempunyai derajat kemurnian pro analisa (p.a), yaitu: metanol, etanol, natrium asetat, asam sitrat, asam asetat, EDTA (*etilen diamin tetra asetat*), kloroform, fenol, natrium klorida (Merck), buffer Tris pH 8.0, SDS (*sodium dodecyl sulphate*), nuklease-P1, alkaline phosphatase, 8-hidroksideoksiganosin (Sigma)

Alat gelas yang dipakai adalah alat gelas yang biasa dipakai di laboratorium, *vortex Thermolyne Type 37600* Mixer, *centrifus eppendorf* (Centrifuge 5403 dan 5415), inkubator 37° C (Forma Scientific), pipet *eppendorf* berbagai ukuran, *tube eppendorf*, DNA SEEDVAC (DNA 110), Spektrofotometer, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*, HP 1100)

Cara kerja

Penentuan konsentrasi dan motilitas spermatozoa

Penentuan konsentrasi dan motilitas spermatozoa dilakukan menurut petunjuk WHO (1992)

Isolasi DNA

Isolasi DNA sperma dilakukan dengan metode Kao *et al.* (1995). Sperma dicuci dengan dua kali volum buffer fosfat pH 8.0 sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan *osmotic shock* dengan cara diinkubasi pada suhu 8° C selama 20 menit. Pemecahan sel dengan cara ditambahkan 0,5 ml buffer lisis yang mengandung 2 ml buffer PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3 yang mengandung 50 mM KCl; 0,01% b/v gelatin); 0,6 mL MgCl₂ 50 mM; 1 mL Proteinase-K 20 mg/ml; 50 ml DTT (Dithiothreitol) 20 mM dan 10 mL SDS (Sodium Dodecyl Sulphat) 0,1%. Campuran kemudian diinkubasi pada 37°C selama 12 jam. Selanjutnya dilakukan inaktivasi Proteinase-K, dengan pemanasan pada 95° C selama 10 menit, dan disentrifus pada 14.000 rpm selama tiga menit. Ekstraksi DNA dilakukan dengan cara penambahan fenol-kloroform. Pada campuran ditambahkan satu kali volum larutan fenol (dalam buffer Tris-HCl pH 8.0) dan dicampur dengan menggunakan vortex, kemudian disentrifus pada 12.000 rpm selama tiga menit. Fase air

dipindahkan pada *tube eppendorf* lain dan ditambahkan satu kali volum fenol-kloroform (25:24), divortex dan disentrifus pada 12.000 rpm selama tiga menit. Proses dilanjutkan dengan memindahkan fase air pada *tube eppendorf* lain untuk kemudian ditambahkan satu kali volum kloroform, vortex dan disentrifus lagi pada 12.000 rpm selama tiga menit, fase air dipindahkan pada *tube eppendorf* lain dan ditambahkan 2,5 kali volum etanol (100%), dicampur dan didiamkan pada -20°C selama 10 menit. Presipitat DNA diperoleh pada 4°C, 14.000 rpm selama 10 menit. DNA yang diperoleh dikeringkan dengan Vacum SPEEDVAC (DNA SPEEDVAC, DNA 110, Savant) dan dilarutkan dalam buffer TE (Tris-EDTA, pH 8.0)

Penentuan konsentrasi 8-hidroksideoksiganosin

DNA hasil isolasi untuk penentuan 8-OH-dG difragmentasi dengan cara, ditambahkan 200 mL. natrium asetat 20 mM (pH 4.8). Kemudian didigesti dengan menambahkan 20 mg Nuklease-P1 (Sigma) dan diinkubasi pada 37° C selama 30 menit. Setelah inkubasi tersebut, ditambahkan 20 mL. Tris-HCl 1M (pH 7,4); 1,3 unit alkaline fosfatase (Sigma) dan diinkubasi lagi pada 37° C selama 60 menit. Selanjutnya hasil fragmentasi dianalisis dengan menggunakan HPLC (Xu *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1995; Cahill *et al.*, 1997; Sudjarwo, 2002).

Analisis data

Korelasi 8-OH-dG dengan motilitas spermatozoa menggunakan uji korelasi (MedCalc), uji beda makna digunakan uji t-test (Microsoft Excel) dan nilai batas dengan ROC Curve (MedCalc).

HASIL

Dari 53 sampel sperma yang diambil secara acak, setelah dilakukan analisis rutin kualitas sperma menurut WHO (1992) terdiri atas 14 *asthenospermia*, 4 *oligospermia* dan 35 *normozoospermia*.

Dari koleksi sampel sperma, dilakukan analisis kualitas sperma menurut petunjuk WHO (1992) seperti dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi dan motilitas spermatozoa

Diagnosa klinik	N	Konsentrasi spermatozoa (10 ⁶ /ml)	motilitas (%)
Oligospermia	4	13,6750 ± 0,3498	43,7500 ± 0,3930
Asthenospermia	14	32,5571 ± 0,5395	32,5714 ± 0,3031
Normozoospermia	35	82,6857 ± 0,7139	65,6571 ± 0,1394

Keterangan: N = jumlah sampel

Pada analisis kualitas sperma (Tabel 1), diperoleh hasil baik jumlah dan motilitas spermatozoa pada oligospermia dan asthenospermia yang rendah bila dibandingkan dengan normozoospermia. Selanjutnya dilakukan penentuan kadar 8-OH-dG untuk menjelaskan hubungannya dengan motilitas yang merupakan salah satu indikator infertilitas pria.

Validasi metode HPLC untuk penentuan kadar 8-OH-dG di dalam sperma telah dilakukan, dengan memberikan hasil: perolehan kadar kembali (*Recovery*) 8-OH-dG 95,7207% yang dilakukan dengan menggunakan kolom RP-18 (5 cm, 12 cm), fase gerak aquadest: metanol (80: 20) yang mengandung buffer 12,5 mM asam sitrat (pH 5,1), kecepatan alir fase gerak 0,5 ml/menit, panjang gelombang 294 nm, detektor DAD (*Diode Array Detector*) (Sudjarwo, 2002).

Pada penentuan kadar 8-OH-dG (fmol/ng DNA) diperoleh rata-rata $18,3571 \pm 0,5489$ (*normozoospermia*); $50,9571 \pm 0,3465$ (*asthenospermia*); $54,7600 \pm 0,2259$ (*oligospermia*).

Tabel 2. Konsentrasi 8-OH-dG di dalam sperma

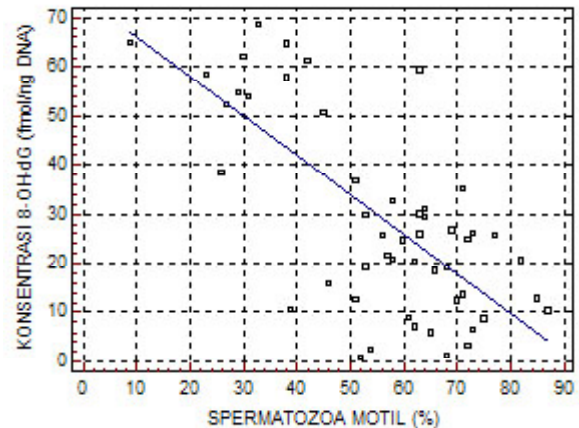
Diagnosa klinik	Konsentrasi 8-OH-dG (fmol/ng DNA)
Oligospermia (N = 4)	$54,7600 \pm 0,2259$ **
Asthenospermia (N = 14)	$50,9571 \pm 0,3465$ *
Normozoospermia (N = 35)	$18,3571 \pm 0,5489$ *, **

*) analisis uji beda makna dengan t-test (Microsoft Excel) antara normospermia dengan asthenospermia ($p < 0,01$) dan **) normozoospermia dengan oligospermia ($p < 0,01$). N: jumlah sampel

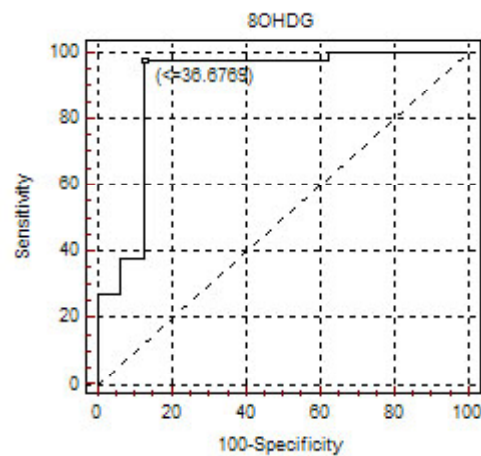
Dengan membandingkan konsentrasi 8-OH-dG untuk memperoleh uji beda makna dengan menggunakan uji t-test (Microsoft Excel) diperoleh perbedaan yang bermakna antara normospermia dengan asthenospermia (* $p < 0,01$) dan normospermia dengan oligospermia (** $p < 0,01$).

Korelasi terbalik diperoleh antara konsentrasi 8-OH-dG dengan spermatozoa *motile* yaitu $r = -0,7111$ ($p < 0,01$), yang dapat dijelaskan bahwa tingginya konsentrasi 8-OH-dG akan diperoleh sedikit jumlah spermatozoa *motile*.

Nilai batas 8-OH-dG di dalam sperma yang mempunyai hubungan dengan motilitas spermatozoa yang dianalisis dengan program "ROC Curve" (MedCalc) menghasilkan kadar 8-OH-dG = 36,6769 fmol/ngDNA (Gambar 2).



Gambar 1. Korelasi 8-OH-dG dengan spermatozoa *motile*



Gambar 2. Nilai batas (*Cut-Off*) 8-OH-dG di dalam sperma dengan motilitas spermatozoa

PEMBAHASAN

Hasil analisis rutin kualitas sperma menurut WHO (1992) dari koleksi sampel terdiri atas berbagai macam diagnosa klinik dari subjek pria yang datang dengan rutin untuk konsultasi. Dari koleksi sampel setelah dianalisis kualitas sperma terdiri atas: 14 asthenospermia, 4 oligospermia, dan 35 normospermia.

Kelainan sperma dapat dilihat dari konsentrasi 8-OH-dG, di mana pada oligospermia dan *asthenospermia* lebih besar bila dibandingkan dengan *normozoospermia*. Hal ini dapat menunjukkan bahwa kerusakan DNA akibat oksidasi lebih tinggi.

Kerusakan DNA dapat ditunjukkan dari tingginya 8-OH-dG. Pada keadaan “*steady state*” 8-OH-dG 10 kali lebih tinggi di DNA mitokondria dari pada di DNA inti, dan meningkat secara dramatis pada proses penuaan (Anson *et al.*, 1998; Sauza-Pinto *et al.*, 1999). Sangat penting untuk mengidentifikasi faktor-faktor yang dapat menyebabkan risiko kelainan genetik yang bertanggung jawab terhadap perubahan genetik. Senyawa 8-OH-dG adalah promutagenik kelainan DNA dari hasil oksidasi deoksiganosin oleh radikal oksigen (Shimoda *et al.*, 1994).

Sifat ROS adalah oksidator, di mana dalam kadar yang tinggi akan mengoksidasi DNA. Nukleotida guanin adalah nukleotida yang rawan terhadap oksidasi, dengan hasil akhir 8-OH-dG (Sai *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1992; Hasegawa *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1990; Kasai and Nishimura, 1984; Chung and Xu, 1992). Terbentuknya 8-OH-dG pada DNA menginduksi perubahan G:C ke T:A terutama pada replikasi DNA (Shimoda *et al.*, 1994). Adanya akumulasi kerusakan DNA endogen akan berpengaruh pada proses transkripsi RNA (Holmes *et al.*, 1992).

Spermatozoa *immotile* disebabkan oleh oksidasi atau kerusakan DNA yang dapat ditunjukkan oleh tingginya kadar 8-OH-dG yang berhubungan dengan menurunnya sintesis energi. Dalam kondisi fisik normal, oksidan diproduksi oleh sperma (Alvarez and Storey, 1989; Alvarez *et al.*, 1987; Aitken and Clarkson, 1987; Ruiz-Pesini *et al.*, 1998). Seperti yang dilaporkan oleh McLeod (1943), bahwa oksidan yang tinggi berpengaruh terhadap menurunnya motilitas spermatozoa. Motilitas spermatozoa adalah salah satu faktor penyebab terjadinya infertilitas pria.

Dari nilai batas 8-OH-dG tersebut dapat dijelaskan, bahwa sperma dengan kadar 8-OH-dG di atas nilai batas ambang (36,6769 fmol/ngDNA) termasuk dalam sperma yang tidak normal. Hal ini disebabkan tingginya 8-OH-dG mempunyai hubungan dengan rendahnya spermatozoa *motile*. Hal yang sama berlaku sebaliknya, yaitu apabila kadar 8-OH-dG di bawah nilai batas ambang, termasuk dalam sperma yang normal. Kadar 8-OH-dG yang rendah mempunyai hubungan dengan banyaknya jumlah spermatozoa yang *motile*. Seperti yang telah dilaporkan sebelumnya, bahwa kadar 8-OH-dG mempunyai hubungan terbalik dengan jumlah spermatozoa *motile*. Tingginya 8-OH-dG merupakan salah satu indikator kerusakan DNA.

Hasil akhir dari oksidasi DNA adalah senyawa 8-OH-dG. Tingginya senyawa 8-OH-dG di dalam sperma mempunyai korelasi terbalik dengan spermatozoa *motile*. Salah satu faktor penyebab terjadinya infertilitas pria adalah motilitas spermatozoa yang rendah. Sehingga tingginya senyawa 8-OH-dG di dalam sperma manusia dapat sebagai salah satu indikator infertilitas pria.

Dari hasil penelitian ini dapat disarankan, senyawa 8-OH-dG sebagai hasil akhir dari oksidasi DNA di dalam sperma manusia dapat sebagai salah satu indikator infertilitas pria.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih ini kami sampaikan kepada Tim Proyek Risbin IPTEKDOK 1997/1998, karena dukungan dana penelitian ini sehingga penelitian ini dapat terlaksana.

KEPUSTAKAAN

- Aitken RJ, and Clarkson JS, 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction. and Fertility* 81: 459–69.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco I, Storey BT, 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology* 8: 338–48.
- Alvarez JG, and Storey BT, 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation; *Gamete Research* 23: 77–90.
- Anson RM, Croteau DL, Stireum RH, Filburn C, Parsell R and Bohr VA, 1998. Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed region and strands of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Research* 26 (2): 662–8.
- Cahill A, Wang X, and Hoek JB, 1997. Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption; *Biochemical and Biophysical Research Communications*: 235, 286–90.
- Chung FL, and Xu Y, 1992. Increased 8-oxodeoxyguanosine levels in lung DNA of A/J mice and F344 rats treated with the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Carcino-genesis* 13: 1269–72.
- Hasegawa R, Chujo T, Sai-Kato K, Umemura T, Tanimura A and Kurokawa Y, 1995. Preventive effects of green tea against liver oxidative DNA damage and hepatotoxicity in rats treated with 2-nitropropane. *Food Chemistry and Toxicology* 33: 11, 961–70.
- Holmes GE, Bernstein C, and Berstein H, 1992. Oxidative and other DNA damages as the basis of aging: a review. *Mutation Research*: 275, 305–15.
- Kao SH, Chao HT, Wei YH, 1995. Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biology of Reproduction* 52: 7129–736.
- Kasai H and Nishimura S, 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Research* 12: 2137–45.
- Lehninger AL, 1982 (Terjemahan) Dasar-dasar Biokimia, Jilid I. Penerbit Erlangga, Jakarta.

- McLeod J, 1943. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *American Journal of Physiology* 138, 512–8.
- Ozawa T, 1995. Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 1271: 177–89.
- Richter C, 1992. Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research*: 275, 249–55.
- Ruiz-Pesini E, Diaz C, Lapena AC, Perez-Martos A., Montoya J, Alvarez E, Arenas J, and Lopez-Perez MJ, 1998. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clinical Chemistry* 44(8): 1616–20.
- Sai K., Umemura T, Takagi A., Hasegawa R, and Kurokawa Y, 1992. The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Japanese Journal of Cancer Research* 83: 45–51.
- Shimoda R, Nagashima M, Sakamoto M, Yamaguchi N, Hirohashi S, 1994. Increased formation on oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxy-guanosine, in human livers with hepatitis. *Cancer Research* 54: 3171–2.
- Sies and Menck, 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research*: 275: 367–75.
- Sohal RS, and Brunk UT, 1992. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutation Research*: 275, 295–304.
- Souza-Pinto N, Croteau DL, Hudson EK, Hansford RG, and Bohr VA, 1999. Age-associated increase in 8-oxo-deoxy-guanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Research* 27(8): 1935: 42.
- Sudjarwo, 2002. Validasi metode HPLC pada penentuan kadar 8-hidroksi-deoksiguosin di dalam sperma. *Journal. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (Journal of Mathematics and Science), Universitas Airlangga* 7(2): 103–7.
- Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, and Kurokawa Y, 1990. Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long term exposure to three peroxisome proliferation; di(2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate. *Cancer Letters* 53: 33–8
- World Health Organization, 1992. WHO Laboratory Manual for Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. 3rd Ed. Cambridge University Press, New York.
- Xu Y, Ho C, Amin SG, Han C, and Chung F, 1992. Inhibition of Tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Research* 52(15): 3875–9.

Reviewer: **Drs. Win. Darmanto, MSi., Ph.D.**