

## EFEK EKSTRAK TESTIS TERHADAP JUMLAH IMPLANTASI DAN JUMLAH ANAK PADA MENCIT (*Mus musculus*)

Sri Puji Astuti Wahyuningsih, Listijani Suhargo, Kushendarsasi

Laboratorium Biologi Reproduksi

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Airlangga

E-mail: tuti\_suryanto@yahoo.com

### ABSTRACT

*Extract of testis contains the testis specific proteins. The testis proteins may raise immune responses. The immune responses are the antibodies against testis specific anti-protein. The reaction between the antibodies and the sperms can inhibit fertilization. This process has contraception effects. This research used 24 female and 20 male mice strain Balb/c. The experiment used the complete random design with 4 concentration treatments (0, 500, 1000, and 2000 µg extracts of testis) and 3 replications. Mice were injected 3 times with time interval 21 days. After 15 days from the rising of vaginal plug, 3 mice were dissected and counted the implantation. The others mice were waited until delivered of the children. The datas were analyzed by ANOVA and LSD ( $\alpha = 5\%$ ). The results showed that extract of testis did not influence the amount of implantation at the uterus endometrial, but it decreased the amount of children. The effective concentration of extract testis is 2000 µg. So, this study showed that the intraperitoneum injection of the extract of testis had contraception effects.*

**Key words:** testis extract, implantation, *Mus musculus*

### PENGANTAR

Pertambahan jumlah penduduk dari tahun ke tahun meningkat secara tajam. Menurut data dari Badan Statistik Jakarta tahun 2000, penduduk Indonesia berjumlah 205.843.000 orang. Jumlah penduduk yang sangat besar dan peningkatan jumlah penduduk yang cukup tinggi akan berdampak negatif. Beberapa usaha telah dilakukan untuk menekan jumlah penduduk, yaitu mengurangi angka kelahiran (natalitas) melalui berbagai metode KB, yaitu penggunaan hormon, IUD, tubektomi, dan vasektomi, atau obat topikal yang bersifat spermisida.

Penggunaan kontrasepsi hormonal sering mempunyai efek samping seperti pusing, mual, muntah, keputihan, jerawat, depresi, dan gangguan psikis (Pabadja, 1992), rasa nyeri, perubahan berat badan, dan gangguan menstruasi (Sastrawinata, 1980). Penggunaan IUD sering menimbulkan iritasi dan keputihan bagi wanita yang kulitnya peka. Penggunaan obat topikal dapat menyebabkan iritasi dan ketidaknyamanan bagi pemakai. Sedangkan, tubektomi dan vasektomi merupakan metode kontrasepsi yang sifatnya tetap atau menghentikan kehamilan.

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian lagi untuk mengembangkan kontrasepsi yang efektif dengan sedikit atau tidak ada efek samping. Alternatif yang dirasa aman adalah penggunaan imunokontrasepsi. Menurut Yatim (1994), salah satu keuntungan dari imunokontrasepsi adalah kontrasepsi bersifat sementara, artinya kesuburan bisa dikembalikan lagi. Menurut Feng *et al.* (1999),

imunokontrasepsi adalah kontrasepsi yang diberikan secara injeksi menggunakan suatu bahan yang bersifat antigen dan bertujuan untuk mencegah pertemuan antara sel telur dan sperma. Beberapa bahan yang bersifat antigenik adalah sperma, zona pelusida (ZP), atau antigen hormonal. Menurut Naz dan Vanek (1998), ekstrak testis juga bersifat antigenik karena mengandung bermacam-macam protein spesifik testis.

Naz dan Vanek (1998) menyatakan bahwa protein spesifik yang terdapat dalam testis dapat digunakan untuk pengembangan vaksin kontrasepsi. Protein spesifik yang digunakan adalah protein spesifik testis non-enzim dan protein spesifik testis enzimatis. Protein yang berperan dalam fusi antara sperma dan ovum antara lain: *mouse sperm antigen* (MSA-63) yang homolog dengan protein SP-10 pada manusia, NZ-1, dan *fertilization antigen-1* (FA-1). Protein enzim spesifik testis antara lain *acrosin*, *dehydrogenase-C4* (LDH-C4), *phosphoglycerate kinase-2* (PGK-2), *cytochrome*, dan *glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase-5* (GAPDS) protein.

Protein-protein tersebut mempunyai kemampuan untuk menimbulkan respons imun. Respons imun yang terjadi berupa respons imun nonspesifik dan respons imun spesifik. Produk akhir dari respons imun spesifik adalah terbentuknya antibodi, dalam hal ini terbentuk antibodi antiprotein spesifik testis yang mempunyai efek kontrasepsi. Reaksi antara antibodi dengan sperma yang masuk saat fertilisasi dapat menghambat fungsi sperma dan mengganggu kemampuan fertilitas. Beberapa gangguan pada kemampuan

fertilitas antara lain aglutinasi sperma, reduksi motilitas sperma, gangguan penetrasi mucus serviks, tidak efisiennya fusi sperma dan telur, dan peningkatan fagositosis sperma. Adanya antibodi antiprotein spesifik testis juga dapat menyebabkan matinya embrio pre- atau pascaimplantasi. Vaksin kontrasepsi dapat diimunisasikan pada individu jantan atau betina dan akan berakibat terjadinya antifertilitas (Naz dan Vanek, 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak testis yang mengandung bermacam-macam protein spesifik testis terhadap jumlah implantasi dan jumlah anak pada mencit (*Mus musculus*). Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kemungkinan pemanfaatan ekstrak testis sebagai imunokontrasepsi.

## BAHAN DAN CARA KERJA

### Bahan

Mencit *Mus musculus* betina sebanyak 24 ekor dan jantan sebanyak 18 ekor, galur Balb/c, berumur 2–3 bulan, berat 20–30 gram. Mencit diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma, Surabaya.

### Cara Kerja

#### Pembuatan Ekstrak Testis dan Cara Imunisasi

Testis dari 10 ekor mencit dihilangkan lapisan tunika albuginea. Testis dicacah dan dibuat homogenat dalam PBS pH 7 dengan alat homogenizer pada kecepatan 4000 rpm selama 25 menit. Homogenat disaring. Cairan hasil penyaringan *disentrifuge* dengan kecepatan 6000 rpm selama 30 menit dalam suhu 4° C dan akan terbentuk 3 lapisan. Lapisan lemak berada di permukaan, cairan bening berada di bagian tengah, dan endapan berada di bagian bawah. Cairan bening di bagian tengah diambil dan dijadikan serbuk dengan cara *fresh dryer*.

Mencit yang diimunisasi dengan ekstrak testis adalah mencit betina. Mencit dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok I imunisasi dengan 0  $\mu\text{g}$  ekstrak testis (control), kelompok II imunisasi dengan 500  $\mu\text{g}$  ekstrak testis, kelompok III imunisasi dengan 1000  $\mu\text{g}$  ekstrak testis, dan kelompok IV imunisasi dengan 2000  $\mu\text{g}$  ekstrak testis. Imunisasi dilakukan secara intraperitonium. Imunisasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan selang waktu 21 hari.

Pada imunisasi pertama, ekstrak testis dilarutkan dalam PBS sebanyak 0,05 ml dan diemulsikan dengan 0,05 ml *Freud's complete adjuvant* (FCA). Pada kontrol, mencit

diimunisasi dengan 0,1 ml PBS tanpa ekstrak testis (0  $\mu\text{g}$ ). Pada imunisasi kedua dan ketiga menggunakan ekstrak testis dalam PBS 0,05 ml dan diemulsikan dengan 0,05 ml *Freud's incomplete adjuvant* (FICA).

### Penghitungan Jumlah Implantasi dan Jumlah Anak Mencit

Setelah ketiga imunisasi dilakukan, maka mencit betina tersebut dikawinkan dengan mencit jantan. Setelah mencit berhasil kopulasi yang ditandai dengan adanya *vaginal plug*, dilakukan pengamatan adanya kebuntingan. Hari pertama adanya *vaginal plug* dianggap hari ke nol kebuntingan. Jumlah implantasi dihitung setelah 15 hari adanya dari hari ke nol kebuntingan, kemudian mencit dibedah dan diamati uterusnya. Sedangkan, perhitungan jumlah anak mencit dilakukan setelah mencit-mencit tersebut melahirkan.

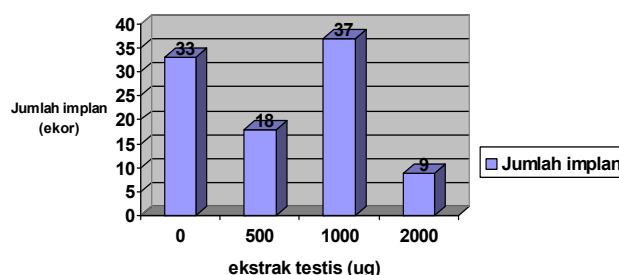
Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan terhadap jumlah implantasi dan jumlah anak mencit dianalisis menggunakan uji Anava ( $\alpha = 5\%$ ). Apabila terdapat perbedaan bermakna, maka analisis dilanjutkan dengan uji LSD. Program statistik yang digunakan untuk analisis data adalah program SPSS for Windows.

## HASIL

**Tabel 1.** Jumlah implantasi pada endometrium uterus mencit dan hasil uji Anava setelah perlakuan imunisasi dengan ekstrak testis 0, 500, 1000, dan 2000  $\mu\text{g}$

Ulangan	Jumlah implantasi pada kelompok perlakuan (ekor)			
	0 $\mu\text{g}$	500 $\mu\text{g}$	1000 $\mu\text{g}$	2000 $\mu\text{g}$
1	10	9	14	0
2	10	9	13	9
3	13	0	10	0
Jumlah	33a	18a	37a	9a

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata secara statistik ( $\alpha = 5\%$ )

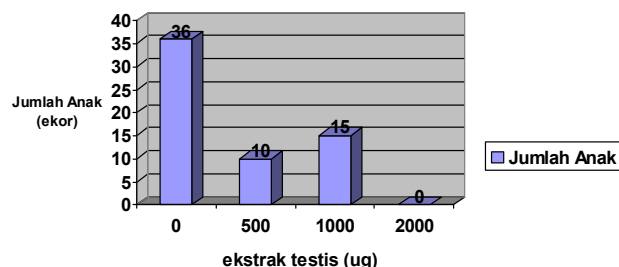


**Gambar 1.** Grafik jumlah implantasi pada endometrium uterus setelah perlakuan imunisasi dengan ekstrak testis 0, 500, 1000, dan 2000  $\mu\text{g}$

**Tabel 2.** Jumlah anak mencit yang dilahirkan dalam satu periode kebuntingan dan hasil uji LSD setelah perlakuan imunisasi dengan ekstrak testis 0, 500, 1000, dan 2000  $\mu\text{g}$

Ulangan	Jumlah anak mencit pada kelompok (ekor)			
	0 $\mu\text{g}$	500 $\mu\text{g}$	1000 $\mu\text{g}$	2000 $\mu\text{g}$
1	12	10	9	0
2	11	0	6	0
3	13	0	0	0
Jumlah	36a	10b	15ab	0b

Keterangan: angka yang diikuti dengan huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata secara statistik ( $\alpha = 5\%$ )

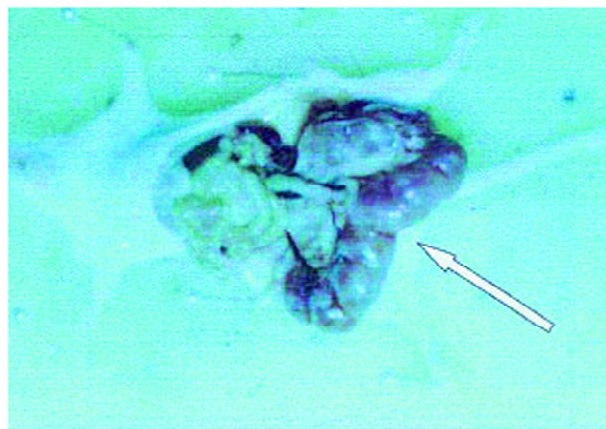


**Gambar 2.** Grafik jumlah anak mencit yang dilahirkan setelah perlakuan imunisasi dengan ekstrak testis 0, 500, 1000, dan 2000  $\mu\text{g}$

**PEMBAHASAN**

Berdasarkan uji Anava terhadap jumlah implantasi terlihat bahwa tingkat signifikansi yang didapat sebesar 0,062, lebih besar dari  $\alpha = 0,05$  sehingga hal tersebut menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara masing-masing kelompok perlakuan. Secara statistik, perlakuan imunisasi dengan antigen ekstrak testis tidak menurunkan fertilitas dari mencit. Walaupun demikian, jika dilihat dari jumlah implantasi dari keempat perlakuan cenderung menurun, terutama perlakuan imunisasi dengan antigen ekstrak testis pada konsentrasi 2000  $\mu\text{g}$ . Gambaran adanya implantasi pada mencit dapat dilihat pada Gambar 3.

Faktor utama penurunan jumlah implantasi adalah sifat imunogen yang dimiliki oleh protein-protein spesifik yang terdapat dalam testis sehingga bila antigen tersebut diimunisasikan pada mencit betina akan merangsang terbentuknya respons imun spesifik berupa antibodi antiprotein spesifik testis. Apabila sperma masuk dalam tubuh mencit betina, maka pada saat kopulasi akan dianggap sebagai antigen bagi sistem pertahanan. Sperma akan bereaksi dengan antibodi antiprotein spesifik testis yang berakibat pemblokiran sperma oleh antibodi. Hal tersebut mengakibatkan beberapa penetrasi sperma ke oosit terhambat. Dengan demikian jumlah fertilisasi juga berkurang dan berakibat terjadi penurunan jumlah implantasi.



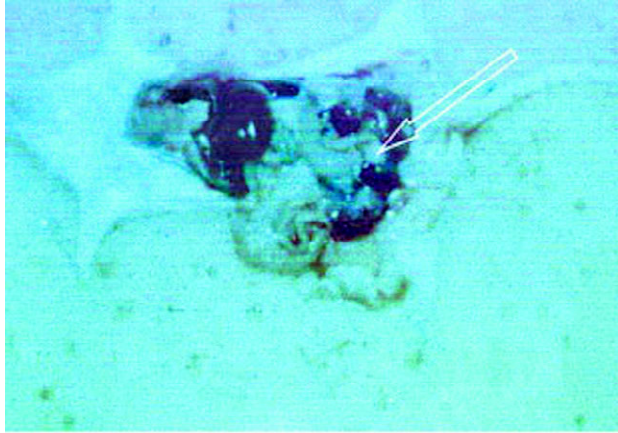
**Gambar 3.** Implantasi pada mencit

Berdasarkan uji Anava terhadap jumlah anak mencit yang dilahirkan dalam satu periode kebuntingan terlihat bahwa ada perbedaan yang nyata di antara kelompok perlakuan. Hal tersebut ditunjukkan dengan nilai signifikansi sebesar 0,023, lebih kecil dari  $\alpha = 0,05$ . Kemudian, analisis statistik dilanjutkan dengan uji LSD. Berdasar uji tersebut didapat bahwa jumlah anak mencit yang dilahirkan antara kontrol dengan perlakuan imunisasi antigen 500 dan 2000  $\mu\text{g}$  menunjukkan beda nyata. Sedangkan, perlakuan dengan imunisasi antigen ekstrak testis pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g}$  tidak berbeda nyata dengan kontrol dan perlakuan ekstrak testis 500  $\mu\text{g}$ .

Penurunan jumlah anak pada mencit terutama terjadi pada perlakuan antigen ekstrak testis konsentrasi 2000  $\mu\text{g}$ . Jadi perlakuan tersebut paling menghambat terjadinya fertilisasi karena tidak satupun mencit yang mengalami kehamilan.

Berdasarkan hasil analisis statistik, penelitian efek antigen ekstrak testis terhadap jumlah implantasi dan jumlah anak pada mencit terlihat bahwa jumlah implantasi tidak berbeda nyata di antara perlakuan, sedangkan jumlah anak mencit mengalami penurunan setelah perlakuan. Hal ini diduga adanya gangguan pascaimplantasi atau matinya embrio setelah implantasi. Seperti pernyataan Naz dan Vanek (1998) bahwa adanya antibodi antiprotein spesifik testis dapat menyebabkan matinya embrio pre- atau pascaimplantasi.

Hal tersebut juga didukung dengan data saat pembedahan, yaitu adanya beberapa implantasi yang tereabsorpsi pada kelompok perlakuan. Oleh karena adanya gangguan pada pascaimplantasi, maka perlu sekali dilakukan penelitian lagi untuk membuktikan apakah ekstrak testis akan aman bila digunakan sebagai vaksin dalam imunokontrasepsi.



**Gambar 4.** Implantasi yang mengalami reabsorpsi

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak testis tidak berpengaruh terhadap jumlah implantasi pada dinding endometrium uterus mencit, tetapi imunisasi dengan antigen ekstrak testis berpengaruh terhadap jumlah anak mencit yang dilahirkan. Imunisasi dengan antigen ekstrak testis pada konsentrasi 2000  $\mu\text{g}$  paling efektif terhadap penurunan jumlah anak.

Saran penelitian adalah perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak testis mencit tersebut terhadap hewan coba lain spesies seperti tikus, kelinci atau kambing. Hal yang menjadi pertimbangannya bahwa pembentukan antibodi sangat dipengaruhi oleh sifat keasingan dari antigen, semakin asing antigen maka semakin mudah terbentuk antibodi. Dengan demikian proses fertilisasi mudah terhambat.

#### KEPUSTAKAAN

- Feng H, Sandlow JL, Sparks AE, dan Sandra A, 1999. Development of an Immunocontraceptive Vaccine. *Journal Reproduction Medical*. 44(9): 759–65.
- Naz RK, dan Vanek CM, 1998. Testis-Specific Proteins and Their Role in Contraceptive Vaccine Development. *Bioscience* 1, e39–48, April 30, 1998. [Http://www.bioscience.org/1988/v3/e/naz/3/htm](http://www.bioscience.org/1988/v3/e/naz/3/htm).
- Pabadja S, 1992. Materi Kampanye Ibu Sehat Sejahtera untuk Kader Departemen Kesehatan RI. Jakarta.
- Sastrawinata SR, 1980. Teknik Keluarga Berencana. Elstar Offset, Bandung.
- Yatim W, 1994. Reproduksi dan Embriologi, edisi ke-3. Penerbit Tarsito, Bandung.

Reviewer: **Prof. Dr. Sutiman B. Sumitro**