

# DETEKSI MUTASI EXON 7 GEN PORIN TIPE 3 (hVDAC3) PADA PASIEN PRIA INFERTIL ASTENOZOOSPERMIA

Titien Sumarsih<sup>1</sup>, dan Cut Fauziah

Departemen Biologi, Fakultas Kedokteran UPN "Veteran" Jakarta  
Jl. RS. Fatmawati Pondok Labu Jakarta Selatan 12450  
Telp. 021 7656971

## Abstract

Male infertility is as important as female infertility that both are needed to be taken into consideration diagnostically as well as therapeutically. One of the parameters that contribute in male fertility is spermatozoa motility. Sperm motility plays a significant role in promoting the sperm capability of reaching the ovum. Therefore, any defect in sperm motility is often the cause of male infertility. The patient suffering from this problem is known as asthenozoospermia. Asthenozoospermia is attributable to mitochondrial dysfunction. Voltage dependent anion channel (VDAC) or porin is an ion channel in the outer membrane of mitochondria, and this channel is responsible for ATP transportation in and out of mitochondria. The method adopted in this research consists of some phases: the first stage is to collect the sperm of 2 samples before embarking on DNA isolation, the second phase is to amplify the sperm DNA in region exon 7 of hVDAC3 gene by using specific primer. Process of amplification was conducted by applying the PCR method. Gene mutation was determined by electrophoresis using 2 % agarose gel, then is followed by sequencing stage. The mutation in exon 7 gene hVDAC3 occurring in asthenozoospermia patient disturbance of the function of the outer membrane mitochondria to conduct ATP transportation.

**Key Words :** asthenozoospermia, infertile, hVDAC3, mutation.

## PENDAHULUAN

Infertilitas pada pria merupakan masalah yang perlu ditangani secara bersama-sama dengan infertilitas pada wanita dalam penatalaksanaan diagnosis dan terapi pasangan suami istri yang ingin memiliki anak. Dari hasil penelitian World Health Organization (WHO) di beberapa Negara diketahui bahwa dalam masalah infertil pada pasangan suami istri, yaitu sekitar 15% dari pasangan suami istri usia subur, 20% di antaranya murni disebabkan oleh faktor suami, 38% disebabkan oleh faktor istri, 27% disebabkan oleh keduanya dan 15% disebabkan oleh faktor-faktor yang tidak diketahui (WHO, 1987 dalam Huynh et al, 2002).

Salah satu parameter yang berperan dalam fertilitas pria adalah motilitas spermatozoa. Motilitas sperma sangat penting dalam kesanggupan mereka

untuk mencapai ovum, mencapai membran telur dan mengadakan penetrasi. Oleh karena itu gangguan motilitas sperma sering menjadi penyebab infertilitas pada pria. Pasien dengan masalah ini dikategorikan sebagai asthenozoospermia. Asthenozoospermia ditandai dengan rendahnya motilitas spermatozoa atau tidak mempunyai kemampuan untuk bergerak sama sekali. Penderita asthenozoospermia memiliki presentase sperma motil progresif lurus kurang dari 25 % atau persentase sperma motil progresif lurus dan progresif lambat kurang dari 50% (WHO, 1992). Kemampuan gerak yang lurus dan cepat sangat diperlukan sperma untuk menempuh perjalanan sepanjang organ reproduksi wanita sampai pada tuba falopii dan untuk menembus lapisan-lapisan luar sel telur dalam proses fertilisasi (Eddy and O'Brien, 1994 ; Nagy et al, 2000).

Asthenozoospermia dapat terjadi akibat adanya disfungsi pada mitokondria, sehingga menyebabkan terjadinya insufisiensi energi yang dikeluarkan

<sup>1</sup> Kontak Person : Titien Sumarsih  
Departemen Biologi, FK UPNV Jakarta  
Telp. 021 7656971

(Folgero et al, 1993) atau aksonema yang tidak dapat berespon terhadap ATP yang keluar pada flagelnya (Yeung et al, 1998). Asenozoospermia selain disebabkan oleh adanya gangguan fungsi mitokondria, juga dapat disebabkan oleh adanya infeksi pada saluran reproduksi, defek pada proses pematangan spermatozoa di epididimis, adanya kelainan morfologis dan biokimia pada aksonema di bagian ekor (Bourgeron, 2000).

Sperma membutuhkan energi dalam bentuk ATP untuk bergerak, yang diperoleh dari proses respirasi (*Fosforilasi oksidatif*) dalam mitokondria pada bagian *midpiece* spermatozoa. Setelah disintesis di dalam mitokondria, ATP ditransportasikan ke aksonema pada bagian ekor, untuk selanjutnya dikonversi oleh enzim ATPase yang ada di bagian tersebut menjadi energi untuk pergerakan sperma (Cooper, 2000 ; Bourgeron, 2000).

*Voltage Dependent Anion Channel* (VDAC) atau Porin merupakan kanal ion dengan berat molekul 30–35 kDa yang terdapat pada membran luar mitokondria. Kanal ini bertanggung jawab atas keluar masuknya metabolit dari dan ke dalam mitokondria. Kanal protein ini pertama kali ditemukan pada sel eukariota dalam ekstrak mitokondria *Primaecium aurella* dan berhasil dipelajari sifat biofisiknya melalui penelitian *planar lipid bilayer*. Sebagai kanal ion, porin 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 (Colombini, 2004). Selain itu, pori yang dibentuk oleh porin ini juga permeable terhadap ion  $Ca^{2+}$ . Sampai saat ini telah berhasil diidentifikasi 3 tipe porin dengan tingkat homologi yang tinggi (Blachly-Dyson, 2001). Protein VDAC2 dan VDAC3 ditemukan dalam jumlah yang cukup tinggi dalam *outer dense fiber* (ODF) flagella sperma *bovine*, sehingga diperkirakan protein VDAC berperan dalam mempertahankan integritas dan fungsi sitoskeletal flagella.

Penelitian dengan teknik *knock-out mouse* pada gen VDAC3 menemukan bahwa porin (VDAC) sebagai kanal ion memegang peranan penting dalam proses perolehan energi (ATP) untuk motilitas spermatozoa. Mencit jantan mutan yang didelesi 4 exon terakhir gen VDAC3 adalah sehat tetapi infertil, yaitu tidak dapat menghasilkan keturunan ketika dikawinkan dengan mencit betina yang sehat dan fertil. Mencit tersebut mempunyai jumlah/konsentrasi spermatozoa normal tetapi mengalami penurunan dalam motilitasnya (Sampson et al, 2001).

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan

Untuk isolasi DNA dari sperma : Sampel sperma dari pasien astenozoospermia dan normozoospermia, larutan Kremer untuk *swim up* sperma, lautan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) yang mengandung NaCl, KCl,  $NaHPO_4$  dan  $H_2O$ , *Cell Lysis Solution*, DTT (*dithiothreitol*), proteinase K, RNase, *protein precipitaton solution*, etanol 70%, Na asetat 3 M, larutan TE atau *DNA Hydration Solution*.

Untuk Amplifikasi fragmen DNA : hasil isolasi DNA sperma, aquadestilata steril, *Tag DNA Polymerase* (Promega catalog #M1661), primer DNA, Kit untuk reaksi PCR (*PCR Core kit* dari Promega) yang berisi : 200  $\mu$ l dNTP mix (10 mM untuk setiap dATP,dCTP,dGTP,dTTP pH 7,0), 1,2 ml *buffer* reaksi PCR 10 x, *magnesium free* (10 mM tris-HCl pH 8,0, 50 mM KCL dan 0,1 % triton® X-100) dan 1,2 ml larutan  $MgCl_2$ .

Untuk mendeteksi hasil PCR : hasil PCR, *gel agarose* 2%, aquadestilata, *buffer TAE* 10x (pH 8,4), *ethidium bromide*, *Loading dye* terdiri dari : zat warna *bromphenol blue* dan *xylene cyanol*, petanda ukuran DNA (100 bp DNA Ladder). Larutan TAE 1X yang terdiri dari : Tris Base, EDTA, *glacial acetic acid* dan  $H_2O$  yang ditambahkan sampai volume mencapai 250 ml.

Untuk mendeteksi adanya mutasi dilakukan sekuensing dengan menggunakan *Big Dye Terminator Mix through the ABI 377 A Sequencer* di BPPT (Badan Penerapan dan Pengembangan Teknologi) menurut metode standar.

### Cara kerja

#### Isolasi DNA dari Sperma manusia

DNA genom diperoleh dari sperma pria dengan kategori normozoospermia dan astenozoospermia, sperma yang didapat dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi dan di *Swim up* dengan menggunakan medium Kremer, *Swim up* dilakukan dengan cara memasukkan 2,5 ml semen ke dalam tabung 15 ml dengan cara dituang kemudian tabung tersebut dimiringkan dengan sudut 45°. Selanjutnya tambahkan 2,5 ml larutan Kremer, setelah itu inkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dengan posisi tabung tetap miring 45°, untuk sampel astenozoospermia, setelah diinkubasi selama 30 menit, supernatant dibuang dengan menggunakan pipet Pasteur, kemudian ambil 1 tetes endapan dan teteskan di atas kaca objek untuk memeriksa motilitas setelah *swim up*, dan endapan yang diambil adalah pada bagian *middle bottom* atau sperma yang tidak dapat berenang keatas. Sedangkan untuk sampel normozoos-

spermia diambil sperma yang berenang keatas dengan menggunakan pipet Pasteur steril dari tabung dan pindahan ke tabung 15 ml steril.

### Isolasi DNA dari sperma

Setelah proses *swim up*, sperma yang didapat ditambahkan larutan PBS 1% sebanyak 2 ml, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit, Supernatan dibuang dengan menggunakan pipet Pasteur secara hati-hati, selanjutnya pelet ditambahkan kembali dengan larutan PBS dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 5 menit, Sel-sel spermatozoa dilisis dengan menambahkan 3 ml Cell Lysis Solution, 120 µl DTT, 30 µl proteinase K, dihomogenisasi dengan melakukan *up and down* pipet dan membolak-balikkan tabung sebanyak ± 25 kali, Inkubasi dalam *waterbath* pada suhu 55°C selama 1 jam sampai seluruh sel lisis dan diteruskan inkubasi pada suhu 30°C selama satu malam, Keesokan harinya ditambahkan 30 µl RNase dan tabung kembali di bolak balik ± 25 kali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 15–60 menit, selanjutnya dilakukan presipitasi protein dengan menambahkan 1 ml *Protein Precipitation Solution* kedalam sampel yang berisi RNase dan di vortex dengan kuat selama 20 detik, setelah itu sampel diletakkan pada *ice bath* selama 5 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit, selanjutnya dilakukan presipitasi DNA, dengan cara menambahkan 2 kali volume sampel ethanol absolut dan ½ volume sampel Na asetat 3 M kedalam tabung 15 ml, kemudian tuang supernatant yang mengandung DNA kedalam tabung yang mengandung campuran ethanol absolut dan Na asetat tadi dan dilakukan *inverse* sebanyak ± 50 kali untuk mencampur. DNA akan terlihat sebagai pelet putih, Supernatant dibuang dan tabung dikeringkan di atas kertas absorban yang bersih, tambahkan 2 x 150 µl ethanol 70 % dan bolak-balik tabung beberapa kali untuk mencuci pelet DNA. Selanjutnya sentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit, setelah itu buang ethanol secara hati-hati. Keringkan tabung diatas kertas absorban yang bersih sampai kering selama ± 2 jam, dan kira-kira 2 jam, DNA dilarutkan dengan menambahkan DNA *hydration solution* (TE) kedalam tabung tersebut. DNA yang didapat disimpan pada suhu 4°C selama 1 hari.

### Amplifikasi DNA menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi fragmen gen hVDAC3 exon 7 dilakukan dengan menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dengan *Amplifon*® II *thermolyne*. Reaksi PCR dilakukan dengan cara mencampur : 31,75 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl buffer reaksi

PCR, 5 µl 25 mM larutan MgCl<sub>2</sub>, 1 µl 40 mM dNTP mix (10 mM untuk setiap dATP, dCTP, dGTP, dTTP pH 7,0), 0,25 µl Tag DNA polymerase, kemudian ditambah primer *up stream* 1 µl dan primer *down stream* 1 µl serta DNA cetakan 5 µl, sehingga volume total 50 µl dalam tabung PCR (tabung mikro 200 µl). Kemudian tabung PCR tersebut dimasukkan kedalam mesin PCR yang telah diprogram sebanyak 30 siklus, dengan kondisi amplifikasi: *denaturasi* awal 94°C selama 6 menit, setiap siklus (*denaturasi* 94°C selama 1 menit, *annealing* -58°C selama 40 detik, *extension* 72°C selama 1 menit 30 detik), dan siklus terakhir, suhu *extension* diperpanjang dengan suhu 72°C selama 7 menit. Setelah selesai tabung mikro diangkat dari mesin PCR. Sebagai kontrol positif untuk amplifikasi digunakan primer *β actin forward* (*up stream*) 5' –TgACggggTCACCCACACTgTgCCCATCTA–3' dan *reverse* (*down stream*) 5' – CTAgAAgCATTgCggTggACgATggAggg – 3' dengan *Annealing Temperature* sebesar 81°C dengan ukuran 600 pb.

### Deteksi hasil *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Elektroforesis gel agarose 2%. Pembuatan gel agarose 2% dilakukan dengan cara menimbang 1 gr agarose kemudian dilarutkan dengan cara dididihkan dalam 50 ml TAE 1X selama 2 menit, tambahkan 0,5 µl ethidium bromide, Setelah itu sampel hasil PCR yang telah diberi *tracking dye* dan juga penanda ukuran DNA dipipetkan kedalam sumur-sumur kosong gel kemudian alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply*. Sumur harus terletak pada kutub negative alat tersebut. Dan elektroforesis dijalankan pada 90 volt selama 30 menit. Pita fragmen DNA hasil elektroforesis di visualisasikan dengan menggunakan lampu UV dan difoto dengan kamera Polaroid.

### Sekuensing DNA.

Setelah di elektroforesis dan menunjukkan pita dengan panjang 551pb, kemudian dilakukan sekuensing DNA dengan menggunakan *Big Dye Terminator Mix Through the ABI 377A Sequencer*. Proses sekuensing DNA ini bertujuan untuk membaca urutan basa Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) dan Cytosin (C) dari hasil PCR.

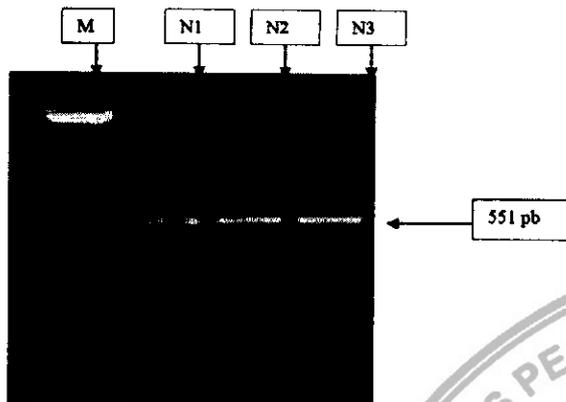
## HASIL

### Isolasi DNA dari Sperma Manusia

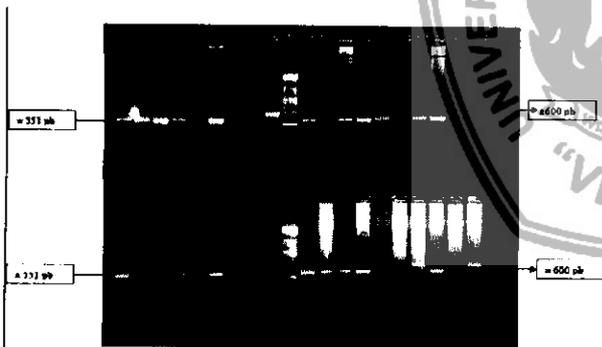
Isolasi DNA dilakukan dari sperma manusia pada 32 pasien pria infertile dengan gangguan astenozoospermia dan 3 orang pria normal (normozoospermia).

Fragmen gen hVDAC3 exon 7 didapat dengan

melakukan amplifikasi DNA genom dengan menggunakan teknik PCR. Hasil PCR yaitu berupa pita-pita DNA berukuran 551 pb. Dari 32 sampel yang digunakan, 4 sampel (13,3%) menunjukkan tidak ada pita yaitu pada sampel A7, A23, A30 dan A32, hasil ini diperkuat setelah dikonfirmasi dengan kontrol positif PCR (primer  $\beta$  aktin) menunjukkan adanya pita yang berukuran ~ 600 pb (gambar 7). Mutasi insersi terjadi pada 1 sampel astenozoospermia yaitu pada A14 dan mutasi substitusi juga terjadi pada 1 sampel astenozoospermia yaitu pada sampel A31.



Gambar 1. Hasil amplifikasi berupa fragmen gen hVDAC3 exon 7 pria normozoospermia N1, N2 dan N3. Hasil PCR di elektroforesis pada gel agarosa 2%. M (marka) adalah DNA ladder 100 pb.



Gambar 2. Hasil amplifikasi DNA berupa fragmen gen hVDAC3 exon 7 pria astenozoospermia (A) dari sampel 1 (A1) sampai sampel 32 (A32) dengan panjang fragmen sebesar 551 pb. M (marka) adalah DNA ladder yang diletakkan di tengah menggunakan DNA Molecular Weight Marker XIV 100 – 1500 pb yang terdiri dari 15 fragmen DNA. Hasil elektroforesis A5 dan A7 sebenarnya menunjukkan adanya band (pita) pada elektroforesis sebelumnya, namun tidak tampak pada hasil elektroforesis ini. Hasil PCR sampel A19 dengan primer exon 7 gen hVDAC3 dan primer  $\beta$  aktin tidak menunjukkan adanya band. Mutasi delesi pada sampel A17, A23, A30 dan A32 tidak menunjukkan adanya band dengan primer exon 7 gen hVDAC3 namun PCR dengan primer  $\beta$  aktin menunjukkan adanya band dengan ukuran  $\pm$  600 pb.

### Hasil Sekuensing

Analisis molekuler exon 7 gen hVDAC3 dapat dilakukan dengan cara mensekuensing hasil PCR yang sudah didapat, kemudian hasil sekuensing sample astenozoospermia dibandingkan dengan exon 7 gen hVDAC3 yang ada di *gene bank (NCBI*

*data bank of nucleotide*) dan dibandingkan dengan hasil sekuensing sampel normal.

Analisis molekuler mutasi delesi dan mutasi substitusi serta mutasi insersi yang menyebabkan perubahan asam amino dapat dilihat pada tabel berikut ini:

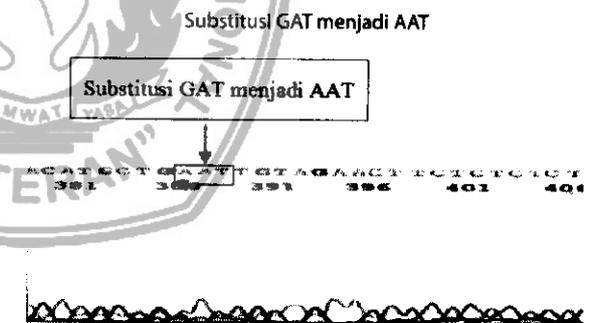
Tabel 1.

Mutasi pada sampel astenozoospermia yang menyebabkan perubahan asam amino penyusun protein hVDAC3.

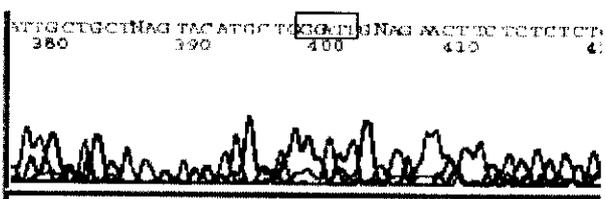
Sampel	Motilitas Progresif Cepat	Motilitas Lambat (b) (%)	Mutasi pada Asam Amino ke-	Perubahan Nukleotida	Perubahan Asam Amino Yang Terjadi	Gambar
A14	0	41	228	Menyusup Basa G (GAT → GGA)	Asp → Gly	Gbr. 13
A31	0	46	228	GAT → AAT	Asp → Asn	Gbr. 14
A17	0	40	-	Delesi	Tdk Terbentuk	Gbr. 11
A23	0	48	-	Delesi	Tdk Terbentuk	Gbr. 11
A30	0	46	-	Delesi	Tdk Terbentuk	Gbr. 11
A32	0	40	-	Delesi	Tdk Terbentuk	Gbr. 11



a. Hasil sekuensing DNA sampel Normozoospermia (N1) sebagai kontrol normal



b. Hasil sekuensing sampel astenozoospermia (A31) yang mengalami mutasi substitusi dari GAT menjadi AAT



c. Hasil sekuensing sampel Astenozoospermia (A14) yang terjadi mutasi insersi

Gambar 3. Hasil sekuensing DNA sampel normozoospermia (a) sebagai kontrol normal yang dibandingkan dengan sampel astenozoospermia (A31) (b) yang mengalami mutasi substitusi dari GAT menjadi AAT yang menyebabkan perubahan asam amino dari asam aspartat menjadi asparagin. (c) yang mengalami mutasi insersi karena penambahan satu basa (G) sehingga terjadi perubahan dari GAT menjadi GGA yang menyebabkan perubahan asam amino asam aspartat menjadi glisin dan selanjutnya.

## PEMBAHASAN

Terjadinya gangguan pada motilitas sperma atau astenozoospermia merupakan salah satu penyebab infertilitas pada pria, dimana motilitas sperma juga merupakan salah satu penentu utama dalam kesuburan pria (Nieschlag & Behre, 2001). Infertilitas astenozoospermia dapat disebabkan oleh adanya gangguan mitokondria, sehingga terjadi insufisiensi energi yang dihasilkan atau oleh aksonem yang tidak dapat merespon terhadap ATP yang keluar pada flagelnya (Folgero et al, 1993), aksonem sperma mengandung enzim dan protein struktural yang berfungsi mengubah energi kimia ATP menjadi gerakan mekanik sehingga menyebabkan motilitas. Kemampuan gerak sperma yang lurus dan cepat sangat penting dalam proses pembuahan, yaitu saat sperma melalui saluran reproduksi wanita dan sampai ke tuba falopii serta ketika sperma harus menembus lapisan-lapisan sel telur. Kemampuan gerak dari sperma tergantung dari integritas struktur dari flagellum dan tersedianya energi dalam bentuk ATP yang dihasilkan oleh mitokondria pada bagian *mid piece* dari flagellum (Cooper and Yeung, 2000).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Sampson et. al (2001) dengan menggunakan pendekatan *reverse genetic*, yaitu dengan teknik *Knock-out mouse* melaporkan bahwa porin (VDAC) sebagai ion kanal pada membran luar mitokondria memegang peranan penting dalam proses perolehan energi (ATP) untuk motilitas spermatozoa. Berdasarkan hasil tersebut maka pada penelitian ini mencari kemungkinan adanya mutasi pada exon 7 gen hVDAC3 pada pasien infertil astenozoospermia. Hasil penelitian ini menunjukkan dari 32 sampel pasien pria infertil astenozoospermia, 1 (satu) sampel (3,33%) mengalami mutasi substitusi yang menyebabkan perubahan asam amino yang menyusun protein hVDAC3. Mutasi substitusi yang terjadi menyebabkan perubahan susunan asam amino ke 228 dari asam aspartat menjadi asparagine, mutasi substitusi ini terjadi karena adanya pergantian satu basa yaitu G → A atau dari GAT (Asp/aspartic acid) menjadi AAT (Asn/asparagine). Asam aspartat merupakan asam amino yang mempunyai rantai samping asam dan hampir selalu bermuatan negatif pada pH fisiologis, sedang asparagine merupakan derivat dari partit acid yang tidak bermuatan (Streyer, 2000). Terjadinya perubahan urutan asam amino ini disugestikan membuat fungsi fisiologis protein VDAC3 terganggu karena urutan asam amino mengandung sinyal yang menentukan kerja protein dan penentuan nasib selanjutnya. Perubahan asam amino akibat adanya mutasi substitusi ini kemungkinan

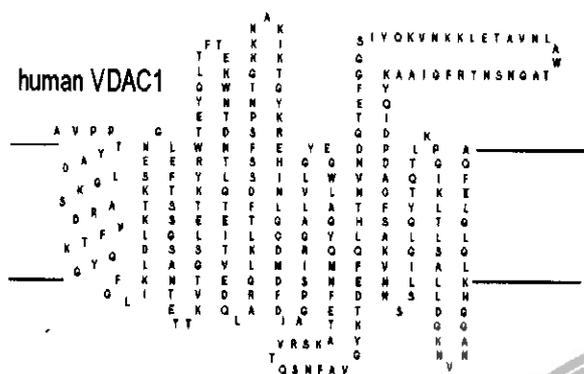
dapat mengakibatkan tahanan aliran ATP bahkan penutupan kanal VDAC karena mungkin terjadi penurunan kontak antara VDAC dengan ANT (Lameshko, 2002). 1 (satu) sampel (3,33%) mengalami mutasi insersi yang juga menyebabkan mutasi *frameshift*, selanjutnya merubah susunan asam amino yang menyusun protein VDAC3. Mutasi insersi ini menyebabkan pengkodean asam amino bergeser, sehingga terjadi perubahan sekuens asam amino mulai dari asam amino ke 228 sampai ke 234 dari protein hVDAC3, yaitu Asp (D), Cys (C), Arg (R), Thr (T), Ser (S), Leu (L), Ser (S) menjadi Gly (G), Leu (L), STOP, Asn (N), Phe (F), Ser (S), Leu (L).

Perubahan atau terjadinya mutasi pada sampel A14 adalah mutasi insersi karena adanya penambahan satu basa, dengan adanya penambahan satu basa tersebut sehingga menyebabkan perubahan rangka pembacaan kodon-kodon triplet. Hal ini dapat menyebabkan urutan asam-asam amino yang sama sekali berbeda. Dengan adanya perubahan nukleotida yang menyebabkan perubahan asam amino mungkin dapat mengganggu fungsi VDAC3, seperti penelitian yang dilakukan oleh Colombini (2004) yang menjelaskan tentang mekanisme pengaturan menutup dan membukanya kanal VDAC ini dapat menurun dengan adanya *single point* mutasi.

Selain itu terjadi mutasi delesi pada 4 orang (13,33%) pasien pria infertil astenozoospermia. Mutasi delesi pada exon 7 gen hVDAC3 ini dapat menyebabkan tidak terbentuknya protein kanal VDAC3 atau protein kanal yang terbentuk mempunyai aktifitas yang kurang optimal, karena terbentuknya struktur protein yang tidak lengkap/ sempurna akibat hlangnya beberapa asam amino yang membentuk struktur primer protein ini. Protein VDAC pada membran luar mitokondria diketahui berperan dalam pengaturan keluarnya ATP dari mitokondria ke sitoplasma, atau pada sperma ke bagian aksonem ekor. Sebagian besar kebutuhan ATP pada sperma yang dihasilkan oleh mitokondria pada bagian *mid piece* ekor, digunakan untuk aktifitas gerak (motilitas) sperma. Adanya mutasi delesi gen hVDAC3 pada sperma selanjutnya dapat menyebabkan tidak berfungsinya protein membran ini secara optimal dalam mengatur keluarnya molekul ATP, yang sangat diperlukan untuk mendukung proses aktifitas geraknya. Penemuan ini menjadi sangat bermakna untuk mengetahui lebih lanjut penyebab keadaan (etiologi) motilitas yang rendah dari sperma-sperma pasien pria infertil astenozoospermia. Keadaan astenozoospermia disebabkan oleh banyak faktor antara lain karena adanya infeksi pada saluran reproduksi, defek dalam proses pematangan sperma di epididimis, adanya krusa-

kan morfologi dan biokimi pada aksonem di bagian ekor sperma serta adanya gangguan pada fungsi mitokondria.

Lokasi mutasi delesi berada pada domain sitoplasmik dan domain transmembran, sedangkan mutasi substitusi dan mutasi inversi yang menyebabkan perubahan asam amino pada VDAC3 adalah pada domain transmembran yang mungkin dapat mengganggu proses keluarnya ATP dari mitokondria, hal ini dapat dilihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Lokasi mutasi insersi (A14) dan mutasi substitusi (A31) pada exon 7 gen hVDAC3. Pada penelitian ini terjadi mutasi insersi sebuah nukleotida G (A14) yang menyebabkan perubahan asam amino ke 228 sampai 243 protein VDAC3, yaitu dari D,C,R,T,S,L,S menjadi G,S,Stop,N,F,S,P dan mutasi substitusi (A31) dari GAT menjadi AAT.

Penelitian yang dilakukan oleh Song *et al.*, 1998 pada *Saccaromices cerevisiae* diketahui bahwa pada kanal VDAC regio 186 sampai 227 banyak mengalami efek mutasi karena sebagian besar regio tersebut terletak pada daerah yang menghadap sitosol. Pada penelitian VDAC3 exon 7 ini sebagian besar regio terletak pada daerah yang menghadap sitosol atau merupakan bagian loop panjang yang menghadap sitosol yang juga merupakan lokasi pengikatan protein yang bersifat hidrofilik, sehingga dapat menyebabkan perubahan muatan.

## SIMPULAN

Sesuai dengan hipotesis yang diajukan maka pada exon 7 gen hVDAC3 pada sperma pasien pria astenozoospermia ditemukan adanya mutasi yaitu mutasi delesi (13,33%), mutasi insersi dan mutasi substitusi masing-masing 3,33%. Protein hVDAC3 mempunyai peran yang penting dalam motilitas sperma. Infertilitas pria dapat disebabkan oleh adanya mutasi pada gen hVDAC3.

Pemeriksaan gen hVDAC3 dapat digunakan untuk mendiagnostik pasien astenozoospermia

yang akan menjalankan reproduksi berbantuan. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui karakter protein hVDAC3 pada pria infertil astenozoospermia sehingga dimasa yang akan datang dapat dikembangkan bahan/zat kontrasepsi pria melalui penghambatannya terhadap aktivitas protein ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albert B., Johnson A., Lewis Y., Raff M., Robverts K., Walter P. 2002. *Moleccular Biology of The Cell*. New York: Garland Publishing.
- Benerjee J, Verma MK, Manne S, Ghosh S., 2006. Self Organized Critically and 1/f noise in single-channel current of voltage-dependent anion channel. *Europhys lett.* 73: 457-8.
- Bourgeron T., 2000. Mitochondrial Function and Male Infertility. *Result Probl. Cell Differ* 28: 187-210.
- Blachy-Dyson and Forte M., 2001. VDAC Channels: Critical review. *IUMB Life* 52: 113-118.
- Buckett WM., 2003. Predictive Value of Hypo-osmotic Swelling Test to Identify Viable Non-Motile Sperm. *Asian J Androl.* 5: 209-212.
- Cooper GM, 2000. *The Cell: A moleccular Approach* USA: Sinauer Associates, Inc. Hal: 389 – 397.
- Colombini M, 2004. VDAC: The Channel at the Interface Between Mitochondrial and the Cytosol. *Mol. And Cell.Biochem.* 256/257: 107 – 115.
- Casadio R., Jacoboni I., Meesina A., De P, V. A. 2002. 3D Model of The Voltage dependent anion channel (VDAC). *FEBS Lett* 520: 1-7.
- Eddy EM., O'Brien DA. The Spermatozoon, 1994. In: *The physiologie of Reproduction*. Eds Knobil, E, Neil JD. New York: Raven Press, Ltd: 29 -77.
- Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod update* 2002: (8): 183 – 198.

- Inaba K. 2003. Molecular Architecture of the sperm flagella: Molecular for motility and signalling. *Zool Sci* 20: 1043 – 1056.
- Lemeshko VV, 2002. Model of the outer membrane potential generation by the inner membrane of mitochondrial. *Biophys J.* 82 : 682–692.
- Mellay VL *et al.* 2002. Negative regulation of mitochondrial VDAC channel by C.Raf kinase. *BMC Cell Biol.* 3 : 14.
- Margaret J, Sampson, William K, Decker, Arthur L, Beaudet, Wim Ruitenbeck, Armstrong D, Hick J, Craigen W, 2001. Immotile sperm and Infertility in Mice Lacking Mitochondrial Voltage-dependent Anion Channel Type 3. *J.Biol.Chemistry* (276) : 42
- Nagy ZP. Sperma Centriole disfunction and Sperm Immotility. *Moll Cell Endocrinol*, 2000; (166) ; 59 – 62.
- Nieshlag E, Behre HM, 2001. *Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction*. Edisi ke-2, Germany : Springer – Verlag Berlin Heidelberg.
- Nayernia K, Adham IM, Gottges EB, *et al.*, 2002. Asthenozoospermia in Mice with Targeted Deletion of the Sperm Mitochondrial-Associated Cysteine Rich Protein (Smcp) Gene. *Mol and Cell Biol.* P. 3046 – 3052.
- Okada SF, O'Neal WK, Huang P., *et al.*, 2005. Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells. *J.Gen Physiol* 124, 513 – 526.
- Sampson MJ, Decker WK, Beaudet, Ruitenbeek W, Armstrong D, Hicks MJ, Craigen WJ. 2001. Immotile sperm and infertility in mice lacking mitochondrial voltage dependent anion channel type 3. *J. Biol Chem* 276 : 39206 – 39212.
- Sambrook J and Russel DW, 2001. *Molecular Cloning, Laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Song J, Midson C, Blachly-Dyson E, Forte M, Colombini M., 1998. The topology of VDAV as probed by biotin modification. *J.Biol.Chem* : 273 : 24406-13.
- World Health Organization, 1992. WHO Laboratory
- manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University press, Cambridge, UK.