

## **Pelacakan Ekspresi Protein pada Testis Mencit (*Mus musculus*) setelah Paparan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*)**

### ***Detection of Expressed Protein in the Mice (*Mus musculus*) Testes After Exposure to Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract***

**Agung Janika Sitasiwi\*, Sri Isdadiyanto, Siti Muflichatun Mardiaty**

Departemen Biologi, Kampus UNDIP Tembalang, Universitas Diponegoro, Semarang

\*Email : [agssiwi@yahoo.co.id](mailto:agssiwi@yahoo.co.id)

Naskah diterima : 25 Januari 2019, direvisi : 6 Mei 2019, disetujui : 24 Mei 2019

#### **Abstract**

*Azadirachta indica* (Neem) has been shown to affect the fertility of mice by interfering with the synthesis of testosterone in mice. The aim of this study was to detect the testes protein expression of mice after exposure to the ethanolic Neem leaf extract. The laboratory animals of this study were 20 male Swiss Webster mice with three months in age and body weight ranging from 22.5 to 27.5 g. The mice were divided into two treatment groups, namely K (control group, exposed with distilled water) and P (treatment group, exposed to ethanolic Neem leaf extract with 14 mg/animal /day). The treatment were given for 21 days and the testicular protein was carried out on the 22nd day. The observed variables were testes weight, concentration and expression of proteins isolated from the testes. The protein concentration was determined by a spectrophotometer at a wavelength of 450nm. The protein expression was observed and determined based on the results of protein electrophoresis (SDS-PAGE). The results showed that protein expression in the treatment group has a lower concentration compared to the control group. This result was confirmed by thinner bands in SDS-PAGE result. Those proteins thought to be a fertility determinant in mammals.

**Keywords** : anti-fertility; Neem; protein expression

#### **Abstrak**

*Azadirachta indica* (Mimba) telah terbukti mempengaruhi fertilitas mencit dengan cara mengganggu sintesis hormon testoteron pada mencit. Penelitian ini bertujuan melacak ekspresi protein pada testis mencit setelah paparan ekstrak etanol daun Mimba. Hewan uji penelitian ini adalah 20 ekor mencit Swiss Webster jantan dengan umur tiga bulan dan bobot badan berkisar 25.5-29.5 gram. Hewan uji dibagi menjadi 2 kelompok perlakuan, yaitu K (kelompok kontrol, dipapar akuades) dan P (kelompok perlakuan, dipapar dengan ekstrak etanol daun Mimba dengan dosis 14 mg/ekor/hari). Pemberian bahan uji dilakukan secara oral selama 21 hari. Variabel yang diamati adalah bobot testes, konsentrasi dan ekspresi protein yang diisolasi dari testis. Isolasi protein testis dilakukan pada hari ke-22. Konsentrasi protein ditentukan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450nm. Ekspresi protein diamati dan ditentukan berdasar hasil elektroforesis protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekspresi protein pada kelompok perlakuan menunjukkan konsentrasi yang lebih rendah dengan pita yang lebih tipis jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kesimpulan penelitian ini adalah paparan ekstrak etanol daun Mimba mengganggu ekspresi protein yang diduga berperan dalam menentukan fertilitas mamalia.

**Kata kunci** : anti-fertilitas; ekspresi protein; Mimba

#### **Pendahuluan**

Testis merupakan organ reproduksi hewan jantan yang berfungsi sebagai penghasil sel kelamin jantan maupun hormon testoteron (Pang and Rennert,

2018). Testis tersusun atas tubulus semeniferus, tempat berlangsungnya proses spermatogenesis, suatu proses perkembangan epitel germinativum membentuk spermatozoa yang fungsional (Jan *et al.*, 2012). Lee *et*

al. (2013) menyatakan bahwa spermatogenesis terjadi melalui proliferasi mitotik sel-sel spermatogonial, pembelahan meiosis pada spermatosit, dan perubahan struktur dari spermatid menjadi spermatozoon.

Proses spermatogenesis merupakan proses yang terjadi karena regulasi ekspresi gen yang terorganisir secara intrinsik, interaktif, dan ekstrinsik. Regulasi secara intrinsik merupakan penentuan macam serta kapan terjadi ekspresi gen tertentu dalam sel germinal. Proses interaktif merupakan regulasi antara sel germinal dan sel somatik dalam perkembangan sel germinal. Regulasi ekstrinsik merupakan pengaturan ekspresi gen oleh faktor eksternal (Lee *et al.*, 2013).

Djureinovic *et al.* (2014) menyatakan bahwa testis memiliki sejumlah gen yang mengatur ekspresi protein untuk perkembangan spermatogonia, spermatosit, spermatid, spermatozoa, sel Sertoli dan sel Leydig. Gen yang berperan dalam berbagai tipe dan tingkat spermatogenesis berjumlah 62 gen dengan ekspresi protein 50 kali lebih banyak daripada jaringan yang lain. Salah satu macam protein yang diekspresikan dalam testis adalah *Androgen Binding Protein*, yang berfungsi mengikat testoteron hasil biosintesis sel Leydig. Tirado *et al.* (2003) menyatakan bahwa penurunan sekresi ABP mempengaruhi penurunan fertilitas pada hewan jantan.

*Azadirachta indica* (Mimba) merupakan tanaman yang mengandung senyawa yang berpotensi sebagai anti-fertilitas pada hewan jantan maupun betina (Suryawanshi, 2011; Dabhadkar *et al.*, 2015) dan mampu menginduksi sterilitas secara temporer (Asif, 2013; Umadevi, 2013). Ekstrak beberapa bagian tanaman mimba menurut Suryawanshi (2011) mempengaruhi laju spermatogenesis, menurunkan motilitas spermatozoa, serta menyebabkan penurunan jumlah sel Leydig. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun mimba memiliki

kemampuan anti-fertilitas (Sharma, 2013; Auta and Hasan, 2016), tetapi mekanisme kerja senyawa tersebut belum diketahui dengan pasti (Sharma, 2013). Berlatar belakang hal tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengetahui mekanisme kerja ekstrak etanol daun mimba yang memiliki potensi anti-fertilitas, melalui pelacakan ekspresi protein pada testis. Hasil penelitian ini diharapkan menjadi rujukan dalam penggunaan atau pengujian senyawa yang dapat mempengaruhi tingkat fertilitas hewan atau manusia.

### Materi dan Metode

Hewan uji yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) Swiss Webster jantan berumur 2 bulan dengan bobot badan berkisar 22.5-27.5 gram. Ekstrak etanol daun mimba dilakukan di Laboratorium Kimia, Universitas Negeri Semarang. Bahan-bahan untuk deteksi ekspresi protein pada testis terdiri dari larutan PBS (Oxoid BR0014G), *acrylamide* (Applichem), *NN-Methylene Bisacrylamide* (UltraPURE), *Sodium Dodecyl Sulphate*, *Ammonium persulfate* (SIGMA), TEMED, protein *marker* (1st BASE), *running buffer* (terdiri dari 12 g Tris 0,05M, 28,8 g Glycine 0,192 M, 2 g 0,1% SDS, akuades), *blotting buffer* (TRIS 0,76 g, *glycine* 3,6 g, methanol 50 ml), pewarna *Coomassie Brilliant Blue*, larutan *destaining* (Methanol 40 ml, Asam Asetat Glasial 10 ml, akuades 50 ml).

Mencit dibagi menjadi kelompok kontrol dan perlakuan. Mencit kelompok kontrol diberi paparan akuades, sedangkan mencit kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol daun mimba dengan pelarut akuades. Dosis ekstrak mimba yang diberikan adalah 14 mg/ekor/hari. Pemberian bahan uji dilakukan sebanyak 0.2 mL/ekor/hari, selama 21 hari. Selama pemeliharaan, mencit diberi pakan dan minum secara *ad libitum* (Sitasiwi *et al.*, 2017).

Isolasi testis dilakukan sehari setelah perlakuan berakhir, yaitu hari ke-22. Hewan uji

dianestesi menggunakan chloroform kemudian testis diisolasi melalui pembedahan pada bagian bawah abdomen. Epididimis serta jaringan yang melekat pada bagian luar testis dibersihkan (Sitasiwi *et al.*, 2018). Testis ditimbang, kemudian testis kanan digunakan untuk deteksi ekspresi protein. Sampel testis dihomogenisasi dengan PBS dengan perbandingan 1:1 (w/v). Campuran sampel testis dan PBS disentrifus secara bertahap, yaitu 700 Xg selama 10 menit pada suhu kamar, selanjutnya supernatan diambil dan dipindahkan pada tabung eppendorf. Supernatan sampel uterus kembali disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 Xg selama 4 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan disimpan dalam eppendorf pada suhu -20°C sampai dilakukan elektroforesa protein. Kandungan protein sampel diukur menggunakan *spectrophotometer* UV dengan  $\lambda$  450 (Sitasiwi *et al.*, 2016).

*Separating gel* elektroforesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah konsentrasi 12%, sedangkan konsentrasi *stacking gel* adalah 3%. Sampel

testis dan bufer sampel dicampur dalam eppendorf 1.5 ml dengan perbandingan 4:1 (sampel:bufer sampel), dipanaskan selama 3 menit dalam air mendidih, kemudian didinginkan dalam wadah berisi es. Campuran sampel dan bufer sampel diisikan ke dalam sumuran sebanyak 20  $\mu$ l sedangkan protein marker diisikan dengan jumlah 6  $\mu$ l. *Running* dilakukan selama 75 menit dengan kuat arus 60 mA dan voltage 125 volt. Deteksi ekspresi protein dilakukan dengan membandingkan antara protein marker, protein dari sampel kelompok kontrol dan protein dari sampel kelompok perlakuan.

### Hasil dan Pembahasan

Respon hewan uji terhadap paparan bahan uji ditunjukkan dengan perubahan bobot testis dan perbedaan kandungan protein testis (disajikan pada Tabel 1). Hasil penelitian ini menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ ) antara kelompok kontrol dan perlakuan, baik pada bobot testis maupun kandungan protein testis.

Tabel 1. Bobot dan kandungan protein testis mencit setelah paparan ekstrak etanol daun Mimba selama 21 hari

	BT (gram) X $\pm$ SD	PT (mg/mL) X $\pm$ SD
K (n=10)	1.25 <sup>a</sup> $\pm$ 0.06	83.03 <sup>p</sup> $\pm$ 4.03
P (n=10)	0.94 <sup>b</sup> $\pm$ 0.07	53.40 <sup>q</sup> $\pm$ 1.25

Ket: Nilai dinyatakan dengan rata-rata  $\pm$  SD. Rataan pada kolom yang sama dengan superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $P < 0.05$ ). BT= Bobot Testis; PT= protein testis

Hasil elektroforesa protein testis disajikan pada Gambar 1. Ekspresi protein kelompok perlakuan (P) menunjukkan pita yang lebih tipis jika dibandingkan dengan protein kelompok kontrol (K). Hal tersebut memberikan bukti bahwa paparan ekstrak etanol daun mimba memengaruhi kuantitas ekspresi protein pada testis hewan uji. Gambar 1 juga menunjukkan ada beberapa protein yang tidak tersekspresi pada kelompok perlakuan (P). Hal tersebut membuktikan bahwa paparan bahan uji juga

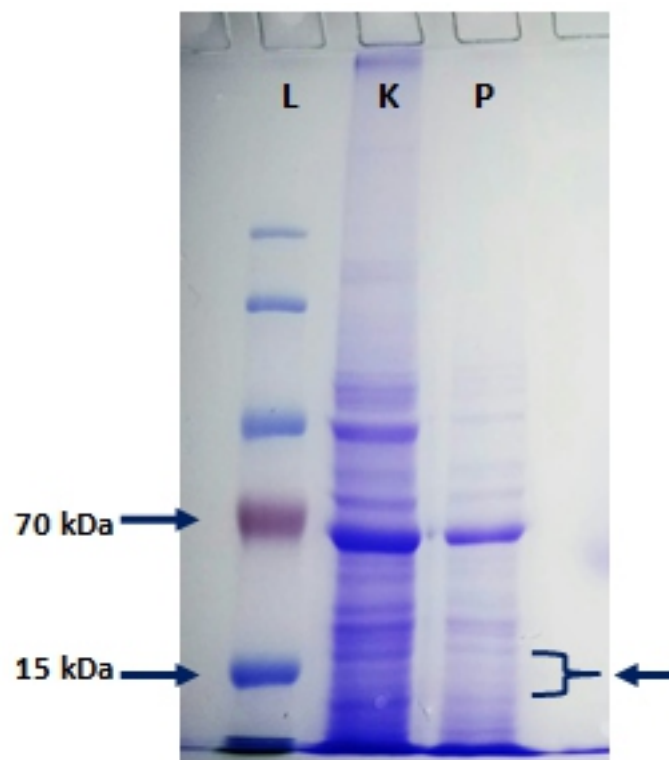
mempengaruhi kualitas ekspresi protein testis.

Protein target pada penelitian ini adalah *Androgen Binding Protein* (ABP) yang dihasilkan oleh sel sertoli, dengan berat molekul sekitar 14-20 kDa. Hasil komparasi dengan *protein ladder* (protein standard) yang digunakan dalam penelitian ini menunjukkan bahwa protein target tidak terdeteksi dalam penelitian ini (ditunjukkan pada Gambar 1. dengan tanda panah biru pada kolom protein yang berasal dari kelompok perlakuan).

Hasil penelitian ini membuktikan terjadinya beberapa tahap gangguan yang ditunjukkan dengan bobot testis dan kandungan protein pada kelompok perlakuan yang lebih rendah daripada kelompok kontrol (Tabel 1.). Hasil elektroforesis protein juga menunjukkan perbedaan tebal pita protein antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan (Gambar 1).

Testis tersusun atas tubulus seminiferus, dengan jaringan interstisial yang terdiri dari sel Leydig, pembuluh darah, makrofag, protein, dan ultrafiltrat yang kaya akan testoteron (Creasy *et al.*, 2012). Gangguan fungsi testis akibat paparan bahan uji diduga berlangsung melalui beberapa tahapan yang berlangsung secara berurutan. Tahap pertama adalah senyawa anti-fertilitas yang dibawa melalui pembuluh darah akan sampai ke ruang interstisial testis sehingga

diduga menyebabkan gangguan struktur dan fungsi sel Leydig. Hal tersebut ditunjukkan dengan penelitian Sitasiwi *et al.* (2018) yang menunjukkan bahwa paparan ekstrak etanol daun mimba menyebabkan gangguan struktur testis. Gangguan struktur sel Leydig menyebabkan gangguan tahap kedua, yaitu biosintesis hormon testoteron yang tertekan. Gangguan tahap yang ketiga terjadi pada spermatogenesis. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Brenner *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa gangguan sintesis testoteron menyebabkan gangguan proses spermatogenesis. Kadar testoteron yang rendah menurut Pang and Rennert (2018) menyebabkan hambatan sintesis protein oleh gen yang diregulasi oleh hormon tersebut, diantaranya adalah gen *Abpb* and *Abpg* yang mengkode *Androgen binding protein* (Emes *et al.*, 2004).



Gambar 1. Hasil elektroforesis protein testis menggunakan SDS PAGE. Keterangan: L: Protein Marker; K: Kontrol; P: Paparan ekstrak etanol daun Mimba

Serangkaian gangguan struktur dan fungsi organ reproduksi jantan dalam penelitian ini diyakini sebagai efek dari paparan senyawa anti-fertilitas yang terkandung dalam ekstrak etanol daun mimba. Ekstrak etanol daun mimba mengandung beberapa senyawa yang diduga kuat memiliki aksi sebagai senyawa anti-fertilitas, yaitu nimbin dan nimbidin (Pankaj *et al.*, 2011; Suryawanshi *et al.*, 2011), steroids (campesterol, beta-sitosterol, stigmasterol), triterpenoid (azadirachtin dan salanin) (Suryawanshi *et al.*, 2011). Bansal *et al.* (2010) menyatakan bahwa senyawa anti-fertilitas bekerja melalui dua aksi, yaitu beraksi dalam mengganggu regulasi hormonal dan sebagai senyawa toksik mengganggu struktur dan fungsi sel penyusun saluran reproduksi.

Senyawa anti-fertilitas yang bekerja dalam regulasi hormon, seperti flavonoid, bekerja dengan cara memberi efek balikan negatif pada sekresi gonadotropin oleh hipofisis sehingga menurunkan sekresi *Luteinizing Hormones* (LH) dan *Follicle Stimulating Hormones* (FSH) (Jan *et al.*, 2012). Penurunan sekresi FSH dan LH pada hewan jantan menyebabkan penurunan biosintesis hormon testosteron (Brenner *et al.*, 2017). Hal tersebut menyebabkan *androgen binding protein* tidak terekspresi (Gambar 1) atau terekspresi dalam jumlah rendah (Tabel 1.).

Ekstrak etanol daun Mimba yang beraksi sebagai senyawa sitotoksik, diantaranya saponin (Francis *et al.*, 2002; Kupradinun *et al.*, 2012), bekerja dengan mengganggu struktur dan fungsi sel-sel penyusun organ reproduksi, termasuk tubulus semeniferus pada testis. Mekanisme gangguan tersebut diduga terjadi dengan cara mempengaruhi stabilitas membran (Pankaj *et al.*, 2011) sehingga memengaruhi biosintesis testosteron pada sel Leydig, atau mengganggu perlekatan LH pada reseptornya di sel Leydig dan FSH pada sel Sertoli. Gangguan stabilitas

membran juga diduga mempengaruhi ketersediaan komponen yang diperlukan untuk biosintesa protein pada testis.

Gangguan biosintesa protein, baik akibat kadar hormon yang rendah maupun gangguan fungsi pada membran sel penyusun organ reproduksi, menyebabkan perubahan ekspresi protein. Hal tersebut menyebabkan kadar protein yang rendah pada kelompok perlakuan (Tabel 1) sehingga menyebabkan bobot testis yang lebih rendah pada kelompok perlakuan, sesuai dengan pernyataan Monteiro *et al.* (2012). Hasil elektroforesis protein menunjukkan bahwa sebagian protein tidak terlacak pada kelompok perlakuan (Gambar 1). Hal tersebut memberikan bukti yang kuat bahwa senyawa anti-fertilitas dalam bahan uji memengaruhi ekspresi gen pada organ reproduksi.

Hasil penelitian ini juga membuktikan mekanisme kerja senyawa anti-fertilitas dalam ekstrak etanol daun mimba menyebabkan gangguan ekspresi protein pada testis, tetapi jenis protein yang terganggu belum bisa dipastikan. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan imunohistokimia atau immunoblotting pada testis untuk memastikan jenis protein yang mengalami gangguan atau hambatan ekspresi oleh senyawa antifertilitas dalam ekstrak etanol daun mimba.

### **Kesimpulan**

Paparan ekstrak etanol daun Mimba memengaruhi ekspresi gen sehingga menyebabkan perbedaan ekspresi protein yang diduga menjadi penentu fertilitas hewan uji.

### **Ucapan Terimakasih**

Penelitian ini didanai dengan Sumber Dana Selain APBN Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Tahun Anggaran 2018 Sesuai Surat Penugasan dari Dekan Fakultas Sain dan

Matematika Universitas Diponegoro tentang Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Nomor: 1754I/UN7.5.8/PG/2018.

#### Daftar Pustaka

- Asif, M. (2013). A review on Spermicidal activities of *Azadirachta indica*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1(5): 61-80.
- Auta, T. dan Hasan, A.T. (2016). Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino mice. *Asian Pacific Journal of Reproduction* x(x):1- 5.
- Bansal, P., Bansal, R., Gupta, V. (2010). Antifertility effects of *Azadirachta indica* (Neem) - A Review. *Annals of Biological Research*. 1(2): 108-113.
- Brenner, L.Z., Roselli, C.E., Recabarren, S.E., Gonzalez Deniselle, M.C. and Lara, H.E. (2017). Developmental and Functional Effects of Steroid Hormones on the Neuroendocrine Axis and Spinal Cord. *J Neuroendocrinol*. 28(7).
- Creasy, D., Bube, A., de Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Nolte, T., Reams, R., Regan, K., Rehm, S., Rogerson, P. and Whitney, K. (2012). Proliferative and Nonproliferative Lesions of the Rat and Mouse Male Reproductive System. *Toxicologic Pathology*, 40: 40S-121S.
- Dabhadkar, D.K., Thakare, V.G., Zade, V.Z., Charjan, A.P., Dhore, M.M., and Deosthale, S.M. (2015). Review on some ethnobotanical plants having antifertility activity in female albino rats. *Int. Res. J. of Science and Engineering*. 3(2): 43-46.
- Djureinovic, D., Fagerberg, L., Hallstrom, B., Danielsson, A., Lindskog, C., Uhlen, M. and Ponten, F. (2014). The human testis-specific proteome define by transcriptomics and antibody-based profiling. *Hum.Reprod*. 20(6):476-88.
- Emes, R.D., Rilley, M.C., Laukaitis, C.M., Goodstadt, L., Kam, R.C. and Ponting, A.P. (2004). Comparative Evolutionary Genomics of Androgen-Binding Protein Genes. *Genome Research*. 14: 1516–1529.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2002). The Biological action of saponins in animal system: review. *British Journal Of Nutrition*. 88:587-605
- Jan, S.Z., G. Hamer, G., Repping, S., de Rooij, D.G., van Pelt, A.M.M., and Vormer, T.L. (2012). Review. Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1822: 1838-1850.
- Kupradinun, P., Tepsuwan, A., Tanthasri, N., Meesiripan, N., Tunsakul, S., Tompat, W., Jarratwisautpom, Y., and Kusamran, W.R. (2012). Toxicity Testing of Flowers of Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss). *Thai J. Vet. Med*. 40(1): 47-55.
- Lee, B. S. Jin, Choi, H., Kwon, J.T., Kim, J., Jeong, J., Kwon, Y. and Cho, C. (2013). Expression and function of the testis-predominan protein LYAR in mice. *Mol. Cells*. 35(1): 54-60.
- Monteiro, J.C., da Matta, S.L.P., Predes, F.S., de Paula, T.A.R. (2012). Testicular Morphology of Adult Wistar Rats Treated with *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth. Leaf Infusion. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 55(1): 101-105.
- Pang, A.L.Y. and Rennert, O.M. (2018). Protein acetylation and spermatogenesis. *Reprod. Syst. Sex. Disord. Suppl* 1:5\_.
- Pankaj, S., Lokeswar, T., Mukesh, B. and Vishnu, B. (2011). Review on Neem (*Azadirachta indica*): Thousand problem one solution. *IRJP*. 2(12): 97-102.
- Sharma, R.K., Goyal, A.K. and Bhat, R.A. (2013). Antifertility of Plants Extracts on Female Reproduction: A Review. *IJBS*. 3(3): 493-514.
- Sitasiwi, A.J., Artama, W.T., Budiyo, A., dan Dharmana, E. (2016). Pelacakan Protein Wnt4 pada Uterus Mencit Swiss Webster. *Jurnal Veteriner UNUD*. Vol.17(1): 22-29.
- Sitasiwi, A.J., Isdadiyanto, S., Mardiati, S.M. (2017). The Estradiol 17- $\beta$  Concentration in Mice after Treated with Ethanolic Leaf Extract of *Azadirachta indica* (Neem). *AIP Conference Proceeding*. ISBN: 978-0-7354-1516-4.
- Sitasiwi, A.J., Isdadiyanto, S., Mardiati, S.M. (2018).

Agung Janika, *et. al.*

Evaluation of testis structures of Swiss Webster mice exposed to ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) leaf extract as herb contraceptive. Proceeding of International Seminar on New Paradigm and Innovation on Natural Sciences and Its Application.

Suryawanshi, J. A. S. (2011). Neem-natural contraceptive for male and female—an overview. *IJBB*. 1(2): 1-6.

Tirado, O.M., Martinez, E.D., Rodriguez, O.C., Danielsen, M., Selva, D.M., Reventos, J., Munell, F., Suarez-Quian, C.A. (2003).

Methoxyacetic Acid Disregulation of Androgen Receptor and Androgen-Binding Protein Expression in Adult Rat Testis. *Biology of Reproduction*, Volume 68. Issue 4: 1437–1446.

Umadevi, K., Sampath Khumar, P.K., Bhowmik, D., and Duraivel, S. (2013). Medicinal Plants with Potential Antifertility Activities. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 1(1): 26-33.