

ALLOTRANSPLANTASI TESTIS MENCIT MUDA SEBAGAI UPAYA PRESERVASI GONAD *IN VIVO*

Wahono Esthi Prasetyaningtyas¹⁾, Kusdiantoro Mohamad¹⁾, Mokhamad Fahrudin¹⁾,
Ita Djuwita¹⁾, Srihadi Agungpriyono^{1,2)}

ABSTRACT

YOUNG MALE TESTES TISSUE ALLOTRANSPLANTATION IN MICE AS MODEL FOR *IN VIVO* PRESERVATION OF GONAD

Cancer diseases are not detected only at adult but also at young age. One therapy for cancer diseases is chemotherapy and radiation, that give a side effect of infertility in the gonad, therefore, it is necessary to preserve the gonad. Sperm collection from adult is easy but not from the young patients. This research was aimed to observe the process and to study the effect of allotransplant in young testis. Transplant was one method to *in vivo* preservation. The testis tissues donor from 5-7 days old mice were cut into small fragments. The recipients were normal and castrated mice of 4 weeks old. The tissues transplanted on subcutaneous dorsal and scrotum. Duration of transplants were 2, 4, 8, and 16 weeks. Histology examination at 2-weeks post transplant showed that the tubules seminiferous were contained only spermatogonia cells and the cells were degenerated. The leukocyte cells were observed on the tissue out of the tubules. At 4 weeks of post transplant, the tubules were destruction, spermatogenic cells were degenerated, spermatogenesis did not yet appear and more leukocyte cells were present. These results showed that testes tissue of 5-days old transplant on 4-weeks recipient were rejected. The type the rejection was acute rejection. The rejection happened at a few week post transplant.

Keyword : *transplantation, testis, mencit muda, spermatogenesis,*

ABSTRAK

Kejadian kanker tidak hanya dialami oleh pasien usia tua namun juga oleh yang berusia muda. Salah satu terapi yang dilakukan pada pasien kanker adalah kemoterapi dan radiasi yang memiliki efek samping pada infertilitas gonad sehingga upaya preservasi gonad merupakan hal yang perlu dilakukan. Pada pria dewasa dapat dilakukan penyimpanan spermatozoa namun hal ini tidak dapat dilakukan pada pasien berusia muda karena belum dihasilkannya spermatozoa sehingga diperlukan upaya penyelamatan lain. Penelitian ini mengamati proses dan efek allotransplantasi testis mencit muda pada mencit dewasa, sebagai model pembelajaran dalam upaya preservasi gonad secara *in vivo*. Sebagai donor jaringan testis adalah mencit muda umur 5-7 hari. Potongan jaringan testis dari 3 ekor mencit muda diambil untuk setiap perlakuan. Lokasi

transplan adalah di daerah subkutan di dorsum dan di skrotum mencit jantan normal dan mencit jantan kastrasi umur 4 minggu, masing-masing sebanyak 3 ekor. Lama transplan adalah 2, 4, 8, dan 16 minggu. Pengamatan menunjukkan bahwa transplantasi selama 2 dan 4 minggu menunjukkan jaringan testis yang ditransplan masih ada sedangkan pada transplan 8 dan 16 minggu sudah tidak ditemukan jaringan testis yang di transplantasikan. Secara histologi, pada transplantasi 2 minggu pada semua perlakuan terlihat masih ada struktur tubuli seminiferi dan terdapat sel-sel radang di luar tubuli. Pada kelompok transplantasi selama 4 minggu pada semua perlakuan terlihat bahwa struktur tubuli seminiferi masih ada, namun batas tubuli mulai tidak jelas, tidak ada proses spermatogenesis, dan ditemukan sel-sel radang di daerah interstitial. Hal ini menunjukkan bahwa telah terjadi penolakan transplan jaringan testis umur 5-7 hari setelah allotransplantasi pada resipien mencit umur 4 minggu dengan sistem imun normal dengan tipe penolakan akut.

Kata Kunci: *transplantasi, testis, hewan muda, spermatogenesis*

¹⁾ Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680. Telp./Fax. 0251-629462. E-mail: anafifarm@ipb.ac.id.

²⁾ Department of Preclinical Veterinary Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia

PENDAHULUAN

Salah satu terapi yang dilakukan pada pasien kanker adalah kemoterapi dan radiasi. Teknik ini mempunyai efek samping pada kelenjar gonad, yaitu menurunkan produksi spermatozoa (testis) maupun oosit (ovarium) bahkan dapat mengakibatkan infertilitas sehingga perlu dilakukan upaya preservasi gonad. Pada pria dewasa yang sudah menghasilkan spermatozoa, penyimpanan spermatozoa sudah umum dilakukan dengan cara pembekuan. Meskipun demikian, kriopreservasi spermatozoa tidak mungkin diaplikasikan pada pasien usia muda karena belum menghasilkan spermatozoa. Padahal anak laki-laki penderita kanker relatif banyak, yaitu 1 dari 650 anak penderita kanker (Shinohara *et al.* 2003) sehingga metode untuk preservasi gonad diperlukan. Salah satu cara preservasi gonad *in vivo* yang memungkinkan spermatogenesis tetap berlangsung adalah dengan metode transplantasi. Metode ini juga bisa diterapkan pada hewan liar yang mengalami kematian pada usia muda sehingga dapat digunakan untuk menunjang upaya konservasi.

Berbeda dengan transplantasi ovarium yang lebih maju, upaya transplantasi testis belum banyak dilaporkan. Testis merupakan organ yang lebih sulit ditangani karena terbungkus dalam kapsula, dengan sirkulasi darah yang lebih kompleks dan sensitif terhadap iskhemia (Nugent *et al.* 1997). Keberhasilan transplantasi testis di daerah abdominal mencit imunodefisiensi (Shinohara *et al.* 2003) telah dilaporkan ada kelahiran dengan teknik mikroinseminasi. Transplantasi testis di bawah kulit pada mencit imunodefisiensi telah dilaporkan sebelumnya oleh Ma *et al.* (2004). Penelitian ini bertujuan melihat kemampuan testis bertahan serta berjalannya spermatogenesis pada resipien pada mencit non-imunodefisiensi, dengan membedakan resipien jantan normal dan jantan kastrasi. Transplantasi testis dilakukan di daerah subkutan dorsal dan di skrotum sebagai upaya untuk memperkecil reaksi penolakan dari resipien.

Salah satu metode yang digunakan untuk preservasi gonad adalah dengan transplantasi testis. Dengan transplantasi testis diharapkan spermatogenesis dapat berlangsung dan sel gamet dapat di-

gunakan untuk menghasilkan keturunan menggunakan teknik mikroinseminasi. Metode ini dapat digunakan pada kasus infertilitas maupun kematian hewan langka yang berusia muda. Dari penelitian yang telah dilaporkan, resipien yang digunakan adalah mencit yang imunodefisiensi yang harganya relatif mahal, maka pada penelitian ini dicari alternatif resipien mencit normal (non-imunodefisiensi) dengan perbedaan lokasi transplantasi, yaitu subkutan daerah punggung dan di skrotum.

METODE

Hewan Coba

Untuk mendapatkan mencit donor umur (5-7 hari), dilakukan perkawinan induk umur 6-12 minggu dengan mencampurakan betina indukan dengan jantan dengan nisbah 1:1. Anak yang didapatkan dari perkawinan normal berkisar 7-13 ekor (Hogan *et al.* 1994).

Mencit jantan berusia ± 2 bulan dikastrasi sebagai mencit resipien. Mencit dianestesi dengan menggunakan ketamin (ketavet®, Delvet Pty Ltd) dengan dosis 11 mg/kg BB dan xilazin (ilium-xylazil®, Troy Laboratories PTY, Limited) dengan dosis 0,1 mg/kgBB secara intramuscular. Setelah teranestesi, disayat bagian skrotum kemudian dikuakkan kulit, tunika dartos, dan tunika vaginalis. Setelah testis terlihat, testis ditarik kemudian diikat funikulus spermannya. Ikatan dilakukan di dua tempat lalu dipotong di antaranya. Setelah selesai, bekas sayatan dijahit lalu dibubuhkan antibiotik untuk mencegah infeksi (Hogan *et al.* 1994).

Transplantasi Testis

Anak mencit jantan yang berusia lima hari, dimatikan dengan cara *dislokasio cervicalis*. Testis yang didapat dipotong untuk mendapatkan ukuran (0,5–1 mm²), kemudian diletakkan dalam *Dulbecco modified Eagle medium* (DMEM) serta *Dulbecco phosphate buffer* (DPBS) dingin. Kemudian potongan testis ditransplantasikan pada mencit jantan normal dan kastrasi sebagai resipien (N dan K). Mencit resipien dianestesi menggunakan ketamin dan xilazin. Setelah mencit teranestesi, kulit daerah punggung (D) disayat kemudian potongan testis diletakkan di bawah

kulit (Snedaker *et al.* 2004, Mohamad *et al.* 2003). Kulit ditutup dengan penjahitan, terakhir dibubuhkan antibiotik pada bekas jahitan untuk mempercepat penyembuhan. Pada mencit yang lain transplantasi dilakukan di daerah skrotum (S). Setiap mencit ditransplantasi dengan 2 potongan testis. Mencit resipien diambil transplan testisnya pada minggu 2, 4, 8, dan 16. Testis hasil transplan yang didapat dilihat secara histologis dan sebagai kontrol dari testis hewan muda. Pada mencit kastrasi setelah dikastrasi dengan metode seperti di atas testis langsung ditransplan di skrotum.

Pengamatan Testis Hasil Transplantasi

Sampel testis hasil transplan termasuk kontrol dibuat preparat histologi untuk diamati. Morfologi testis secara umum diamati dengan menggunakan pewarnaan hematoxilin eosin (HE) sedangkan untuk melihat aktivitas spermatogenesis dengan pewarnaan *asam periodat Schiff* (PAS) (Kiernan 1990). Testis setelah diambil difiksasi dengan larutan Bouin selama 24 jam atau paraformaldehida 4% selama 1 minggu, kemudian disimpan dalam alkohol 70% sebagai *stopping point*. Sampel diproses untuk pembuatan blok parafin dengan terlebih dahulu didehidrasi dalam larutan alkohol dengan konsentrasi bertingkat 70, 80, 90, 95, dan 100% penjernihan dengan xilol sebanyak 3 kali masing-masing 1 jam, diikuti dengan infiltrasi parafin pada suhu 55°C sebanyak tiga kali masing-masing 30 menit dan ditanam dalam parafin (*embedding*). Blok parafin dipotong dengan ketebalan 3-4 µm dengan menggunakan mikrotom putar sebelum diwarnai.

Sediaan kemudian diwarnai dengan pewarnaan hematoxilin eosin (HE) untuk melihat morfologi umum dari testis. Pengamatan dilakukan pada setiap sampel dari testis yang ditransplan di mencit normal daerah di subkutan dorsal selama 2, 4, 8, dan 16 minggu (DN) maupun di skrotum (SN). Perlakuan juga pada mencit resipien yang dikastrasi di daerah subkutan dorsal (DK) serta daerah skrotum (SK).

Aktivitas spermatogenesis lebih mudah terlihat dengan pewarnaan (PAS). Yang diamati ialah adanya tahapan spermatogenesis, diameter lumen, serta tebal epitel tubulus seminiferi. Positif terhadap PAS akan menunjukkan warna merah magenta (Kiernan

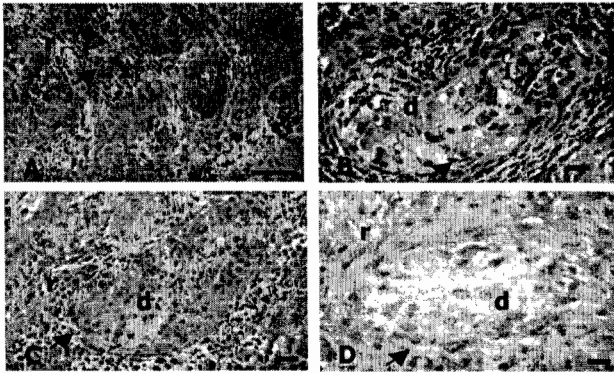
1990). Reaksi positif PAS pada sel spermatogenik dikelompokkan berdasarkan intensitas warna, dibagi menjadi lima kelompok: reaksi kuat (+++), sedang (++), lemah (+), sangat lemah (+/-) dan tidak ada reaksi (-). Bila tidak ada aktivitas spermatogenesis, pewarnaan PAS tidak dilakukan. Dari sediaan histologis diamati juga adanya degenerasi dan adanya sel radang yang menunjukkan terjadinya penolakan dari resipien. Data kualitatif yang didapatkan dikemukakan secara deskriptif dengan foto.

HASIL DAN PEMBAHASAN

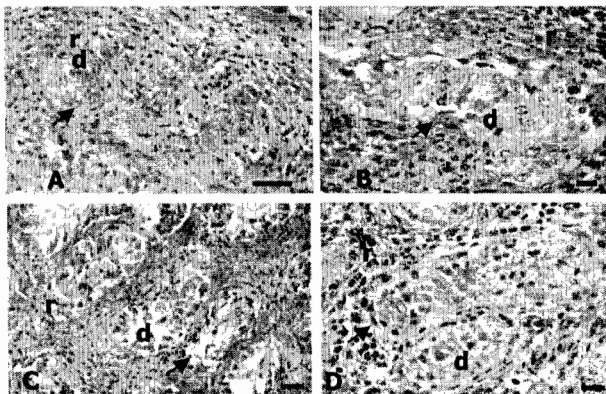
Perlakuan yang diberikan pada penelitian ini adalah perbedaan lokasi tempat transplantasi, yaitu di subkutan dorsal (D) dan di skrotum (S) serta ada perbedaan perlakuan resipien, yaitu yang dikastrasi (K) dan normal (N). Lama waktu transplan ialah selama 2, 4, 8, dan 16 minggu dengan ulangan masing-masing perlakuan 3 kali. Testis mencit umur 5-7 hari yang ditransplantasi selama 2 dan 4 minggu secara makroskopis memperlihatkan adanya invasi pembuluh darah baru (memerah) sekitar lokasi transplan baik pada daerah subkutan dorsal (DN, DK) maupun di skrotum (SN, SK). Sebaliknya, testis yang ditransplantasikan selama 8 dan 16 minggu, ternyata tidak menunjukkan ada testis yang tersisa baik di daerah dorsal maupun di skrotum, dan baik pada resipien normal maupun yang dikastrasi.

Pada perlakuan DN, DK, SN, SK dengan lama transplan selama 2 minggu menunjukkan testis masih ada pada ketiga ekor resipien yang ditransplan. Secara histologis gambaran umum menunjukkan bahwa testis yang ditransplan tubulus semeniferi masih ada dengan struktur yang masih jelas, namun belum terjadi spermatogenesis. Selain itu juga ditemukan adanya sel radang di testis yang ditransplan (Gambar 1). Namun, pada perlakuan DN, DK, SN, SK 4 minggu menunjukkan bahwa dari 3 ekor resipien, testis hanya ditemukan pada 2 ekor resipien. Secara umum pada gambaran histologis terlihat struktur tubulus semeniferi masih ada tetapi membran basal sudah tidak jelas dan tidak beraturan. Spermatogenesis pada testis yang ditransplan selama 4 minggu juga belum berjalan. Sel spermatogenik banyak yang mengalami degenerasi. Sel radang terlihat makin

banyak menyerbu testis (Gambar 2). Gambaran histologis menunjukkan bahwa resipien mencit jantan kastrasi menunjukkan hasil sedikit lebih baik dibandingkan resipien normal.



Gambar 1 Transplantasi testis selama 2 minggu, (A) DN, (B) SN, (C) DK, dan (D) SK. Gambaran umum menunjukkan tubulus masih ada (tanda panah), ditemukan banyak sel radang (r) dan adanya sel spermatogenik yang berdegenerasi (d). Bar = 10µm.



Gambar 2 Transplantasi testis selama 4 minggu. (A) DN, (B) SN, (C). DK, dan (D) SK. Gambaran umum menunjukkan tubulus masih ada walaupun dengan batas yang mulai tidak jelas (tanda panah), ditemukan banyak sel radang (r) dan adanya sel spermatogenik yang berdegenerasi (d). Bar

Perkembangan sampai menghasilkan spermatozoa yang fungsional dari testis yang ditransplan telah banyak dilaporkan pada beberapa spesies, termasuk mencit, kelinci, hamster, babi, kambing, primata dan kucing (Honaramooz *et al.* 2002, Shinohara *et al.* 2002, Ma *et al.* 2004, Schlatt *et al.* 2003, Snedaker *et al.* 2004). Pada penelitian ini

digunakan donor testis dari mencit usia 5-7 hari dengan resipien mencit jantan umur 4 minggu. Dengan umur yang resipien dan donor yang relatif muda diharapkan reaksi penolakan testis yang ditransplan dapat dihindari. Pada umur muda diketahui bahwa sistem immunologis belum berkembang dengan baik karena masih ada pengaruh antibodi maternal (Tizard 1987). Dengan demikian, diharapkan reaksi terhadap adanya organ/antigen asing belum sempurna.

Namun, pada penelitian ini transplantasi selama 8 dan 16 minggu ditolak dan tidak menyisakan testis yang di transplan. Secara imunologis bila jaringan di transplantasikan di antara dua hewan, maka jaringan tersebut akan membangkitkan tanggap kebal (Tizard 1987). Jika organ yang ditransplan, dirusak atau dihancurkan oleh sistem imun maka organ tersebut ditolak (Rossini *et al.* 1999). Ada tiga tipe penolakan dari organ yang ditransplan menurut Rossini *et al.* (1999), yaitu (a) hiperakut, yaitu penolakan terjadi beberapa jam setelah transplan, (b) akut, penolakan terjadi pada bulan pertama transplan, dan (c) kronis, yakni penolakan yang berjalan lambat, perusakan terjadi secara bertahap dan berlangsung lama dari hitungan bulan sampai tahun. Pada penelitian ini penolakan terhadap testis yang ditransplan sampai tidak tersisa terjadi pada minggu ke-8 dan ke-16 pada semua perlakuan. Adapun pada minggu ke-2 dan ke-4 pada semua perlakuan ditemukan adanya sel radang dengan jumlah yang makin bertambah dengan makin lamanya transplan. Hal ini menunjukkan bahwa pada mencit reaksi penolakan dari organ testis yang ditransplantasikan termasuk tipe akut karena terjadi pada hitungan minggu sampai bulan.

Antigen yang ditimbulkan dari sel yang dicangkokkan adalah berupa glikoprotein yang ditemukan pada semua sel bernukleus yang disebut antigen histokompatibilitas (Tizard 1987), dan yang paling imunogenik adalah antigen histokompatibilitas utama (MHC) (Tizard 1987, Rossini *et al.* 1999, Zavazava dan Kabelita 2000). Peran MHC pada reaksi penolakan adalah sebagai antigen yang akan dikenali oleh sel T sehingga sistem imun akan berespons terhadap antigen tersebut (Rossini *et al.* 1999). Sel T tersebut akan mengenali dan menghancurkan sel melalui tiga mekanisme (Rossini *et al.* 1999, Zavazava and

Kabelita 2000), yaitu infiltrasi sel T ke organ yang ditransplan, sel T akan mengenali dan membunuh sel dari organ transplan melalui program *cell death*, serta sekresi sitokine dan interferon yang menginduksi terjadinya apoptosis.

Testis yang ditransplan di subkutan daerah dorsal sel radang terlihat lebih banyak dibandingkan di skrotum. Hal ini disebabkan oleh vaskularisasi darah di daerah dorsal baik. Vaskularisasi darah ini merupakan interaksi awal antara resipien dan organ transplan sehingga memungkinkan infiltrasi sel T dari sistem imun (Rossini *et al.* 1999). Sebaliknya terjadi pada daerah skrotum yang biasanya lebih baik karena daerah skrotum diharapkan dapat menghindari reaksi penolakan berhubung strukturnya yang agak terpisah dengan tubuh dan adanya sistem *barrier* (Hafez dan Hafez 2000). Namun karena pada metode yang digunakan pada penelitian ini setelah dikastrasi langsung dilakukan transplan, mungkin adanya luka dan perdarahan di sekitar skrotum akan meningkatkan sistem imunitas daerah sekitar skrotum.

Keberhasilan transplantasi testis pada penelitian-penelitian yang dilaporkan sebelumnya disebabkan oleh transplantasi dengan organ yang sama dilakukan pada *nude mice*, yaitu pada mencit tersebut secara genetik tidak terdapat sistem imun atau walaupun tidak menggunakan *nude mice* digunakan obat-obatan imunosupresi (Ogawa *et al.* 1997). Pada penelitian digunakan resipien dengan sistem imun normal.

Slatt *et al.* (2003) menyatakan bahwa pada testis mencit yang ditransplan (*allograft*) fungsi endokrinnya pada sel yang di transplan dan *pituitary* mencit resipien akan berjalan normal kembali pada minggu kedua setelah transplan. Namun pada hasil yang diperoleh tidak terlihat adanya spermatogenesis, baik pada perlakuan DN, SN, DK maupun SK dengan lama waktu transplantasi 2 dan 4 minggu. Hal ini diperkuat oleh pernyataan Ma *et al.* (2004), yaitu spermatogenesis pada testis yang ditransplantasikan pada mencit dengan sistem imun yang normal belum pernah dilaporkan sebelumnya karena testis yang ditransplan pada mencit normal ditolak oleh resipien. Nagler *et al.* (2001, diacu dalam Ma *et al.* 2004) menyatakan bahwa hambatan terbesar dalam transplantasi organ adalah reaksi penolakan.

KESIMPULAN

Transplantasi testis mencit umur 5 hari sebagai donor dengan resipien mencit jantan umur 4 minggu dengan perlakuan DN 2 minggu, SN 2 minggu, DK 2 minggu, SK 2 minggu, DN 4 minggu, SN 4 minggu, DK 4 minggu, dan SK 4 minggu menunjukkan testis transplan masih ada. Namun, transplantasi testis selama 8 dan 16 minggu menunjukkan testis sudah tidak tersisa karena reaksi penolakan oleh resipien.

Struktur histologis yang ditunjukkan hampir sama di setiap perlakuan, yaitu struktur tubulus seminiferi masih ada walaupun dengan struktur yang mulai tidak beraturan. Terdapat sel radang yang menginfiltrasi testis serta sel spermatogenik terlihat mengalami degenerasi. Spermatogenesis belum berjalan pada setiap perlakuan.

DAFTAR PUSTAKA

- Hafez B, Hafez ESE. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Ed ke-7. South Carolina: Lipiincott Wiliams & Wilkins.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. 2004. *Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual*. Ed ke-2. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Schöler HR, Dobrinski I, Schlatt S. 2002. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 418: 778-781.
- Kiernan JA. 1989. *Histological and Histochemical Methods, Theory and Practice*. Pergamon Pr.
- Ma P, Ge Y, Wang S, Ma J, Xue S, Han D. 2004. Spermatogenesis following synergistic testicular transplantation in Balb/c mice. *Reproduction* 128:163-170.
- Mohamad K, Budiarta K, Adnyane IKM, Djuwita I, Boediono A. 2003. Siklus estrus dan bobot uterus setelah autotransplantasi ovari secara subkutan pada mencit yang diberi atau tanpa superovulasi. *Hayati* 10:100-105.
- Nugent D, Meirrow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. 1997. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. *Hum Reprod Update* 3:267-280.

- Ogawa T, Aréchaga JM, Avarbock MR, Brinster RL. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol* 41:111-122.
- Rossini AA, Greiner DL, Mordes JP. 1999. Induction of Immunologic Tolerance for Transplantation. *Phys Rev* 79:99-141.
- Schlatt S, Honaramooz A, Boiani M, Schöler HR, Dobrinski I. 2003. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testis. *Biol Reprod* 68:2331-2335.
- Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsui-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Koghisi K, honjo T, Ogura A. 2002. Birth of offspring following testicular transplantat-
ion of cryopreserved immature testicular pieces and in vitro microinsemination. *Hum Reprod* 17:3039-3045.
- Snedaker AK, Honaramooz, Dobrinski I. 2004. A Game of cat and mouse: Xenografting of testis tissue from domestic kittens result in complete cat spermatogenesis in a mouse host. *J Androl* 25:926-930.
- Tizard I. 1987. *Imunologi Veteriner*. Partodirejo M, Hardjosworo S, penerjemah. Surabaya: Airlangga University Pr.
- Zavazava N, Kabelita D. 2000. Alloreactive and apoptosis in graft rejection and transplantation tolerance. *J Leukoc Biol* 68:164-174.