

Karya Ilmiah Andrologi Kedokteran
***Epididymal protease inhibitor (EPPIN)* sebagai Target dalam**
Pengembangan Kontrasepsi



DISUSUN OLEH

Benedikta Diah Saraswati,S.Si., M.Biomed

199704162024062001

FAKULTAS KEDOKTERAN
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

2024

DAFTAR ISI

PENDAHULUAN	1
TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Kontrasepsi Pria	3
2.1.1. Pengembangan Kontrasepsi Pria yang Menargetkan Protein Sperma.....	3
2.2.2. Epididimis dan Pengembangan Kontrasepsi	4
2.2. Epididymal protease inhibitor (EPPIN)	5
2.2.1. Isoform dan Domain dari EPPIN	5
2.2.2. Peranan EPPIN pada sistem reproduksi pria	6
2.3. Pengembangan EPPIN sebagai kandidat kontrasepsi pria	9
2.3.1. Pendekatan imunologik	9
2.3.2. Analisis epitop anti-EPPIN terhadap EPPIN	11
SIMPULAN.....	13

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Pengembangan kontrasepsi pria yang menargetkan spermatozoa	3
Gambar 2. Struktur domain dari EPPIN	6
Gambar 3. Kompleks EPPIN yang menyelubungi permukaan spermatozoa.....	7
Gambar 4. Mekanisme EPPIN mengatur motilitas spermatozoa.....	8
Gambar 5. <i>In silico model</i> yang menggambarkan epitope EPPIN	12

DAFTAR SINGKATAN

CLU	Clusterin
EPPIN	<i>Epididymis protease inhibitor</i>
LTF	Lactotransferin
Phe	Residu fenilalanin
PSA	<i>Prostate specific acantigen</i>
SEMG-1/2	<i>Seminogelin-1/2</i>
SP10	<i>Sperm protein-10</i>
SP17	<i>Sperm protein-17</i>
Tyr	Residu tirosin

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sampai saat ini, berbagai usaha untuk mengembangkan kontrasepsi pria di luar penggunaan kondom dan vasektomi masih memiliki tingkat kesuksesan yang rendah.¹ Selain itu diperlukan pengembangan suatu metode kontrasepsi dengan efektivitas yang tinggi namun bersifat *reversible*. Baik untuk yang sifatnya hormonal maupun non-hormonal sejauh ini masih sampai tahapan uji klinis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pendekatan imunologik terhadap pengembangan kontrasepsi pria memberikan hasil yang menjanjikan. Pengembangan ini dilakukan berdasarkan fakta bahwa kontrasepsi yang tersedia bagi wanita sifatnya sangat efektif dan efisien. Hal ini menyebabkan pengembangan kontrasepsi pria melalui pendekatan imunologik terus dieksplorasi dan dilakukan. Salah satunya adalah dengan mencari inhibitor farmakologi berukuran kecil, seperti *G-protein coupled receptors*, yang mampu menghambat proses pematangan spermatozoa. Akan tetapi, meskipun sejumlah target obat baru yang potensial telah tersedia, namun pengembangan kontrasepsi pria berbasis molekul epididimis masih belum digunakan secara klinik sebelum menjalani percobaan secara *in vitro*, praklinik secara *in vivo* pada hewan model, dan akhirnya percobaan klinik.²

Sejak awal tahun 1990 para ahli di bidang biologi reproduksi fokus terhadap molekul spesifik spermatozoa untuk dikembangkan menjadi kontrasepsi seperti *lactate dehydrogenase isoform 4*, *sperm membrane autoantigen* RSA-1, protein permukaan sperma SP17 dan SP10,³ namun dari kandidat-kandidat tersebut belum ada yang sukses digunakan sebagai agen kontrasepsi karena efektivitasnya yang rendah dan tidak bersifat *sustainable*. Menurut aksi biologisnya, metode kontrasepsi pria dikategorikan menjadi tiga, yaitu 1) menghambat pergerakan sperma ke saluran reproduksi wanita, 2) menekan spermatogenesis, dan 3) mengganggu proses pematangan atau kemampuan sperma dalam memfertilisasi.¹

EPPIN (*epididymis protease inhibitor*) baru-baru ini diidentifikasi dan dikarakterisasikan sebagai molekul yang hanya terdapat pada pria, lebih tepatnya pada testis, dan memiliki potensi yang kuat untuk menjawab masalah kontrasepsi pada pria berbasis protein spesifik spermatozoa yang ada. Spermatozoa testicular tidak dapat memfertilisasi telur sampai sperma tersebut melewati epididimis, struktur anatomi pria yang berdampingan dengan testis dengan proses yang sampai saat ini belum diketahui secara pasti. Setelah itu spermatozoa menjadi matang dan mampu untuk memfertilisasi telur. EPPIN diketahui menyelubungi permukaan spermatozoa sehingga diduga memiliki peranan penting dalam maturasi spermatozoa.⁴

Pengembangan kontrasepsi yang menargetkan EPPIN didasarkan pada penelitian O'Rand yang mencoba melakukan imunisasi anti-EPPIN pada kera dan dari penelitiannya diketahui bahwa antibodi anti-EPPIN yang terbentuk dapat memblokir pengikatan EPPIN-seminogelin 1 (SEMG1) yang penting dalam motilitas spermatozoa dan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi telur. Berangkat dari penelitian tersebut dikembangkan berbagai senyawa aktif yang memiliki fungsi yang sama dengan anti-EPPIN yaitu memiliki kemampuan dalam memproduksi antibody anti-EPPIN. Target molekuler dari EPPIN hanya dapat ditemukan pada saluran reproduksi pria sehingga merupakan target yang spesifik. Senyawa obat yang menargetkan EPPIN diharapkan dapat memberikan efek sistemik minimum terhadap organ tubuh yang lain. Hal ini juga yang mendasari pengembangan kontrasepsi non-hormonal sebagai alternatif kontrasepsi hormonal karena efeknya yang kecil terhadap produksi spermatozoa atau berbagai fungsi lainnya yang bersifat *hormone dependent*.

Makalah ini akan membahas mengenai target kontrasepsi pria non-hormonal secara general, kontrasepsi yang menargetkan EPPIN dan peranan EPPIN dalam sistem reproduksi pria, dan alasan mengapa EPPIN merupakan target yang sesuai untuk kontrasepsi pria.

BAB II

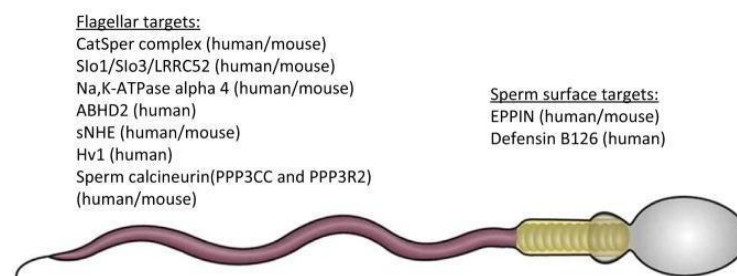
TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kontrasepsi Pria

2.1.1. Pengembangan Kontrasepsi Pria yang Menargetkan Protein Sperma

Sejauh ini kontrasepsi pada pria sebagian besar berupa vasektomi maupun kontrasepsi yang sifatnya hormonal. Kelemahan dari kedua metode yang ada adalah untuk vasektomi yang tidak sepenuhnya *reversible*, dan kondom memiliki tingkat kegagalan yang cukup tinggi.¹ Oleh karena itu mulai di kembangkan berbagai kontrasepsi yang sifatnya hormonal dan non-hormonal. Namun sejauh ini pengembangan untuk kontrasepsi non-hormonal tersebut masih ada di tahap awal. Langkah pertama dalam mengembangkan kontrasepsi non-hormonal untuk pria adalah menentukan target yang bisa diisolasi dan karakterisasi kemudian didemonstrasikan peranannya penting pada proses reproduksi pria.⁵

Berbagai upaya-upaya sebelumnya dalam mengembangkan kontrasepsi pria di luar kondom dan vasektomi baik yang sifatnya hormonal maupun non-hormonal. Jika kontrasepsi hormonal mengacu pada axis hipotalamus-hipofisis-gonad yang mempengaruhi proses spermatogenesis dengan meregulasi pelepasan *gonadotropin-releasing hormone* (GnRH) di hipotalamus dan merangsang sekresi hipogonadotropin seperti *follicle stimulating hormone* (FSH) dan *luteinizing hormone* (LH) di hipofisis, kontrasepsi non-hormonal umumnya menargetkan protein lain yang tidak termasuk ke dalam hormon. Namun untuk kontrasepsi non hormonal target tersebut tidak jelas dan sulit untuk ditentukan (O’Rand 2016). Banyak protein dan atau subunit regulatornya diekspresikan secara eksklusif di sel-sel sperma sehingga menjadi target yang ideal untuk kontrasepsi (Gambar 1).⁶ Selain protein yang terlibat dalam proses spermatogenesis, target lainnya dalam pengembangan kontrasepsi pria adalah berhubungan dengan mengganggu spermatozoa agar tidak fungsional, salah satunya adalah dengan mengganggu motilitas sperma.



Gambar 1. Berbagai protein sperma yang ditargetkan dalam pengembangan kontrasepsi pria.

Protein dapat berupa protein yang menyelubungi permukaan sperma maupun protein yang berada pada flagella.⁶

Terlepas dari kemajuan dalam proses identifikasi struktur dan fungsi protein sperma, pemahaman mengenai signifikansi fungsional dari target kontrasepsi pria sering terhambat karena masih dibutuhkannya kemajuan dalam biologi molekuler dan teknologi terkait. Teknologi *knockout* merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk melihat fungsi dari suatu protein dengan mengganggu ekspresi dari gen yang mengkodekannya. Dalam hal kontrasepsi, salah satu *knockout* pertama yang dilakukan adalah pada gen pengkode reseptor estrogen yang ternyata mampu mempengaruhi fertilitas baik pria maupun wanita.⁷ Berdasarkan hasil tersebut, mulai dilakukan studi yang mengganggu gen yang menyandikan protein spesifik pria yang didemonstrasikan dengan hilangnya fungsi dari protein testis dan epididimis yang berujung pada infertilitas pria. Salah satu contohnya adalah studi yang dilakukan Sonnenberg-Riethmacker (1966) pada gen *c-ros* yang menyandikan reseptor tirosin kinase *c-ros* pada mencit yang berhasil mengungkap fakta bahwa adanya defek pada epididimis tidak mengganggu fungsi produksi atau penyimpanan sperma, melainkan lebih mengganggu maturasi sperma dan kemampuan sperma dalam melakukan fertilisasi *in vivo*.⁸ Prinsip ini mendasari pengembangan kontrasepsi yang menargetkan epididimis maupun protein-protein lainnya pada epididimis.

2.2.2. Epididimis dan Pengembangan Kontrasepsi

Setelah proses spermatogenesis di tubulus seminiferous, secara morfologi spermatozoa telah mature tetapi bersifat non-motil dan tidak mampu untuk memfertilisasi telur. Spermatozoa secara pasif diangkut melalui cairan testis dari tubulus seminiferus ke kaput (kepala) epididimis dengan dibantu oleh kontraksi otot polos dan silia di duktus eferen. Di saluran epididimis, spermatozoa menghabiskan sekitar 12 hari sambil mengalami serangkaian proses maturasi biokimia. Ketika mencapai kauda dari epididimis, spermatozoa mampu untuk memfertilisasi telur. Selama proses maturasi spermatozoa di epididimis itu sendiri, terlibat berbagai protein-protein yang disintesis dan disekresikan oleh epitelium epididimis yang saling berinteraksi satu sama lain. Proses maturasi spermatozoa di dalam epididimis ini sering dihubungkan dengan tingkat fertilitas dari pria, di mana infertilitas pria sering kali dihubungkan dengan adanya gangguan fungsi dari epididimis maupun protein-protein terkait epididimis.⁹ Agar dapat melewati epididimis, selain spermatozoa harus mengalami maturasi, spermatozoa juga harus memiliki gerakan motilitas progresif atau yang disebut sebagai *forward motility*.¹⁰

Mengingat peranannya yang penting dalam proses fertilisasi, epididimis dan berbagai molekulnya sering digunakan sebagai target dalam pengembangan kontrasepsi. Kontrasepsi ini biasa bekerja dengan mekanisme penghambatan terhadap proses maturasi spermatozoa yang dilakukan dengan mem-*blocking* protein-protein epididimis secara.¹¹ Epididimis merupakan salah satu target utama dari pengembangan kontrasepsi pria. Hal ini disebabkan spermatozoa

meninggalkan testis dalam bentuk tidak motil ataupun tidak mampu mengenali atau membuahi sel telur; spermatozoa tersebut harus melewati epididimis untuk memperoleh kemampuan-kemampuan tersebut.¹² Pada mencit yang mengalami *knockout* untuk gen yang menyandikan beberapa protein yang sifatnya spesifik epididymis mengkonfirmasi bahwa epididimis penting untuk maturasi spermatozoa pada mencit tersebut.¹³ Sejauh ini inhibitor yang menargetkan protein spesifik epididymis belum ditemukan.⁵ Namun salah satu kontrasepsi non-hormonal yang paling menjanjikan dan sifatnya *reversible* bekerja dengan menargetkan EPPIN (*epididymal protease inhibitor*) yang selain disekresikan oleh sel sertoli juga disekresikan oleh epitel epididimis dan protein ini menyelubungi permukaan spermatozoa matang.¹⁴ Molekul kecil, inhibitor EP055, menargetkan EPPIN dan menyebabkan infertilitas pada kera yang sifatnya *reversible*. EP055 kemungkinan menargetkan testis dan epididymis karena komponen ini di temukan hanya di dua organ tersebut.^{10,15} Deposisi EPPIN di permukaan spermatozoa paling besar ditemukan pada epididymis, menunjukkan bahwa obat ini bekerja secara spesifik pada epididymis.¹⁵ Selain itu EPPIN juga diketahui terlibat dalam motilitas spermatozoa. Hal ini semakin mendukung pengembangan suatu inhibitor atau antibodi yang menargetkan EPPIN sebagai salah satu pilihan kontrasepsi pria.

2.2. Epididymal protease inhibitor (EPPIN)

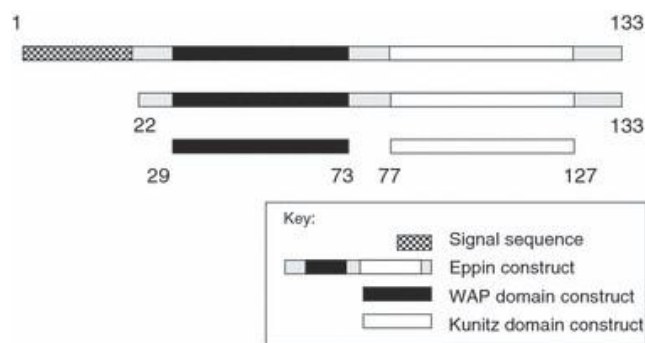
Spermatozoa yang diejakulasikan manusia diselubungi oleh suatu protein yang disebut *epididymal protease inhibitor* (EPPIN) baik pada daerah *head* maupun *tail* spermatozoa.^{4,16} Asal dari lapisan EPPIN ini diduga dari testis maupun epididymis. Ketika spermatozoa bergerak ke duktus efferentes, spermatozoa akan bertemu dengan EPPIN epididymis dan EPPIN kemudian akan terus ada baik di caput maupun cauda epididymal epithelium. Setelah ejakulasi saat spermatozoa menjadi bagian dari koagulum ejakulat, EPPIN menjadi bagian integral dari koagulum tersebut. Spermatozoa yang tertanam di dalam koagulum dilapisi dengan Eppin. Di permukaan spermatozoa ada reseptor untuk EPPIN.⁴

2.2.1. Isoform dan Domain dari EPPIN

EPPIN disintesis oleh sel-sel sertoli. Pada duktus eferentes dan epidimis, EPPIN dalam bentuk isoform 1 disekresikan oleh sel-sel epitelial dan dapat terlihat melapisi permukaan spermatozoa pada epididymis dan permukaan silia dari sel-sel epitel.^{17,4} EPPIN dikodekan oleh gen *EPPIN* pada kromosom 20q12-13.2 yang terdiri dari 4 ekson yang melintang sepanjang 7 kb. Dekat dari lokasi tersebut dengan jarak sekitar 11.5 kb terdapat lokus untuk gen yang mengkodekan semenogelin I (SMEG1) dan II (SMEG2) yang merupakan komponen utama dari cairan semen (Ulvback et al., 1992). Selain itu pada kromosom 20 terdapat juga gen yang

mengkodekan cy-ESP 13.2 yang diekspresikan di epidimis dan gen *CRES* yang mengkodekan inhibitor protease sistein yang sifatnya *androgen-dependent* dan spesifik diekspresikan di *proximal caput epididymis*.¹⁸ Hal ini mengindikasikan bahwa kromosom memiliki peranan penting untuk struktur dan fungsi gen epididimis dan bahwa studi tentang evolusinya dapat memberikan wawasan penting tentang evolusi fungsi epididimis.⁴

EPPIN memiliki 3 *splice variants* yang berhasil diidentifikasi pada testis dan epididymis manusia yang menghasilkan 2 protein isoform. Protein identik yang dikodekan oleh EPPIN-1 dan -3 mengandung sekuen *secretory signal* digolongkan menjadi jenis isoform 1, sedangkan protein yang dikodekan oleh gen *EPPIN2* dan tidak memiliki sekuen *secretory signal* digolongkan menjadi isoform 2.¹⁹ Beberapa variasi *single-nucleotide polymorphisms* dari EPPIN dilaporkan memiliki asosiasi dengan infertilitas pada pria.¹⁰ Pada duktus eferen dan epididymis, EPPIN isoform 1 disekresikan oleh sel-sel epitelial dan melapisi permukaan spermatozoa epididymis dari sel-sel epitel silia.⁴ Sedangkan untuk bentuk isoform 2 jarang ditemukan dan jika ada hanya dapat ditemukan di epididymis dan bukan disekresikan karena tidak hadir sekuen *secretory signal*.⁴ EPPIN terdiri dari 2 domain utama yaitu domain *whey acidic protein* (WAP) yang berada pada ujung N dan Kunitz yang berada pada ujung C (Gambar 2).¹⁰ Kedua domain tersebut termasuk ke dalam domain inhibitor protease yang nantinya akan berperan dalam kemampuan EPPIN melindungi spermatozoa dari protease dan bakteri.¹⁴



Gambar 2. Struktur domain dari EPPIN. EPPIN terdiri dari 2 domain utama yaitu WAP domain dan Kunitz domain. Khusus untuk isoform 1 terdapat sekuen untuk *secretory signal*.¹⁰

2.2.2. Peranan EPPIN pada sistem reproduksi pria

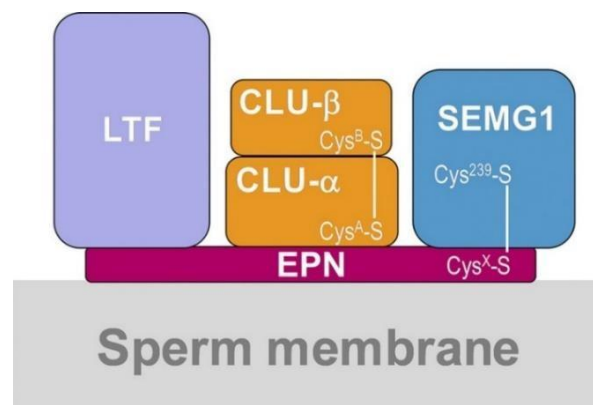
EPPIN diketahui dapat membentuk kompleks dengan Fn dan kompleks EPPIN-Fn ini ditemukan pada bagian *tail*, tepatnya di bagian tengah dari spermatozoa ejakulat manusia. Uji imunopresipitasi menunjukkan bahwa EPPIN di lisat spermatozoa membentuk kompleks dengan Fn dan menggunakan analisis bioinformatika diketahui bahwa EPPIN mengikat Fn pada

fragmen 607-1265. Kompleks EPPIN-Fn ini diduga terlibat dalam proses koagulasi, likuifikasi, dan persiapan spermatozoa untuk pembuahan pada organ reproduksi wanita.²⁰

EPPIN memiliki 3 peranan utama dalam sistem reproduksi pria yang meliputi 1) penghambatan motilitas spermatozoa saat berikatan dengan SEMG1 pada permukaan spermatozoa, 2) memodulasi aktivitas proteolisis PSA terhadap substrat plasma seminal SEMG1, dan 3) aktivitas sebagai antibakteri.^{16,17}

1. Penghambatan motilitas spermatozoa

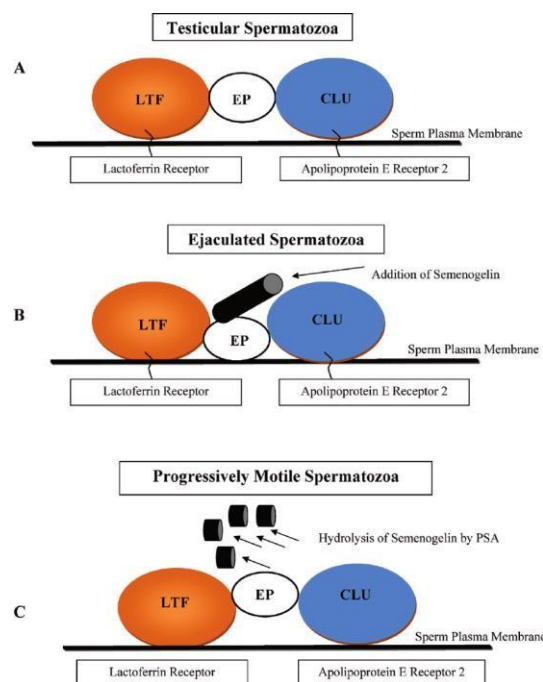
Eppin merupakan suatu protein inhibitor dari enzim protease epididimis yang melapisi permukaan dari spermatozoa. Eppin diketahui dapat berikatan dengan semenogelin, suatu substrat alami dari PSA (prostate specific antigen yang tergolong dalam protease serin) (Gambar 3).¹⁰ EPPIN dapat memodulasi aktivitas dari PSA sekaligus hidrolisis dari SEMG1 itu sendiri.²¹ EPPIN memiliki fungsi dalam pengikatan semenogelin 1 (SEMG1) yang disekresikan vesikel seminal dan fungsi ini berhubungan dengan kemampuan dalam memodulasi motilitas spermatozoa. Plasma semen memiliki kemampuan untuk mengingibisi motilitas spermatozoa ketika bercampur dengan spermatozoa saat ejakulasi. SEMG1 merupakan plasma semen yang berperan sebagai inhibitor dari motilitas spermatozoa. Selama proses ejakulasi SEMG1 berada terikat dengan EPPIN pada fragmen C-terminal. Saat terbentuk ikatan dengan kompleks EPPIN, EPPIN-SEMG1 akan menghambat motilitas progresif dari spermatozoa hingga semenogelin di hidrolisis oleh prostate-specific antigen (PSA). Langsung setelah ejakulasi, PSA yang telah teraktivasi, menghidrolisis semenogelin, menyebabkan likuifikasi dari koagulum semen, dan menghilangkan SEMG1 dari permukaan spermatozoa, sehingga spermatozoa menjadi motil dan kapasitasi dapat terjadi.¹⁰



Gambar 3. Kompleks EPPIN yang menyelubungi permukaan spermatozoa. EPPIN membentuk kompleks dengan *clusterin* (CLU) dan *lactotransferin* (LTF) untuk dapat mengikat semenogelin (SEMG1).¹⁰

EPPIN ditemukan pada permukaan spermatozoa sebagai kompleks yang terdiri dari clusterin (CLU) dan lactotransferin (LTF) yang terdistribusi di sepanjang bagian utama sumbu flagella. EPPIN tidak memiliki reseptornya sendiri, tetapi dihipotesiskan bahwa reseptor LTF dan CLU berkontribusi terhadap stabilisasi kompleks EPPIN di permukaan gamet. Saat diejakulasi, spermatozoa meninggalkan epididymis, kemudian bercampur dengan sekresi vesikula seminalis dan sekresi prostat selama melewati uretra prostat. Kemudian semenogelin (SEMG1) ditambahkan pada kompleks EPPIN/LTF/CLU dan mengikatnya pada permukaan gamet. Segera setelah ejakulasi, EPPIN bergabung dengan koagulum dan PSA memecah semenogelin menghasilkan pelepasan beberapa fragmen proteolitik. Daerah C-terminal dari EPPIN (asam amino 75-133) mengikat fragmen SEMG1 (asam amino 164-283) yang mengandung sistein SEMG1 (asam amino 239). Fungsi fisiologis EPPIN yang utama adalah menghilangkan motilitas spermatozoa dengan mekanisme sebagai berikut (Gambar 4):¹⁰

- A) Kompleks EPPIN yang terdiri dari EPPIN, lactotransferrin, dan clusterin menyelubungi membran plasma dari spermatozoa testicular dan epididimis dengan diikat pada reseptor lactoferrin, apolipoprotein E receptor 2, atau keduanya
- B) Saat terjadi ejakulasi, cairan semen yang mengandung semenogelin yang terikat pada EPPIN pada permukaan spermatozoa. SEMG1 mengikat EPPIN pada spermatozoa menyebabkan spermatozoa kehilangan motilitasnya
- C) Cairan prostat ditambahkan pada ejakulat, *prostate specific antigen* (PSA) diaktivasi dan memulai proses hidrolisis semenogelin sepanjang likuifikasi terjadi, menghilangkan penghalang progresifitas motilitas spermatozoa.



Gambar 4. Mekanisme EPPIN mengatur motilitas progresif spermatozoa.¹⁰

2. Proteksi terhadap PSA

EPPIN memiliki fungsi proteksi terhadap aktivitas protease dengan kemampuannya dalam memodulasi aktivitas PSA. Saat EPPIN tidak ada, PSA bekerja dengan menghidrolisis semenogelin menjadi fragmen-fragmen berukuran kecil. Namun ketika terdapat EPPIN pada permukaan spermatozoa, semenogelin secara parsial terlindung dari hidrolisis oleh PSA. Fungsi ini juga bertujuan untuk melindungi spermatozoa dari kerusakan oleh infeksi bakteri dan enzim proteolysis saat transit pada saluran reproduksi wanita, sekaligus memodulasi aktivitas PSA pada SEMG1 yang terikat dengan EPPIN.¹⁰

3. Antibakteri

EPPIN memiliki 2 domain yang berpotensi sebagai inhibitor protease: domain protein asam *whey* atau empat inti disulfida dan domain Kunitz. Kemampuan sebagai antibakteri ini, terutama untuk bakteri gram negative berkaitan dengan kedua domain EPPIN (protein asam *whey* dan Kunitz) yang juga diekspresikan di *Escherichia coli*. Namun hanya domain Kunitz yang memiliki kemampuan untuk menghambat protease dan membunuh bakteri. Mekanisme sebagai antibakteri adalah dengan permeabilisasi terhadap membrane dalam bakteri, menyebabkan *uncoupling* dari transport electron dan akhirnya menyebabkan *collapse* dari *proton motive force*.²²

2.3. Pengembangan EPPIN sebagai kandidat kontrasepsi pria

Melihat peranannya yang penting dalam memodulasi motilitas spermatozoa dan sifatnya yang spesifik hanya pada organ reproduksi pria, EPPIN mulai dikembangkan sebagai salah satu alternatif kontrasepsi non-hormonal. Prinsip dari pengembangan kontrasepsi yang menargetkan EPPIN ini adalah dengan mengganggu pengikatan antara EPPIN dan SEMG1. O'Rand *et al.* (2004)²³ mencoba melihat potensi dari antibodi terhadap EPPIN untuk digunakan sebagai kontrasepsi dan prinsip kerja antibodi terhadap EPPIN ini dikembangkan untuk melihat senyawa bahan alam dengan mekanisme kerja yang sama. Selain itu Silva *et al.* (2013)¹⁴ melakukan analisis residu asam amino pada epitop tempat pengikatan EPPIN dan SEMG1 untuk nantinya dijadikan target yang akan diganggu sehingga pengikatan EPPIN dan SEMG1 tidak dapat berjalan.

2.3.1. Pendekatan imunologik

Studi imunologi pada kera dilakukan untuk melihat potensi EPPIN sebagai vaksin anti-ferertilitas dengan tujuan mengetahui apakah titer antibody anti- EPPIN dapat mengganggu fungsi reproduksi. EPPIN terlibat dalam maturasi spermatozoa oleh karena itu jika. Oleh karena itu, netralisasi dari EPPIN dapat mengganggu proses maturasi spermatozoa dan pada akhirnya

memiliki efek negative terhadap fertilitas pria. Berdasarkan latar belakang tersebut O'Rand *et al.* (2004)²³ menginvestigasi potensi EPPIN sebagai target dari *immune-contraception* pada kera yang telah disipikan *human-recombinant* EPPIN dan setelah itu diimunisasi anti-EPPIN agar dihasilkan antibody anti-EPPIN. Hasilnya 7 dari 9 kera menghasilkan titer antibody anti-EPPIN yang tinggi dan kera dengan titer antibody anti-EPPIN yang tinggi tersebut bersifat infertil. Semua kera tersebut tidak mampu menghamili kera betina, sedangkan kera control yang hanya disuntukin ajuvan masih dapat menghamili kera betina. Setelah 450 hari semenjak imunisasi terakhir, kapasitas menghamili 5 dari ke-7 kera tersebut kembali dan diiringi dengan penurunan titer antibody. Ketika titer antibody tersebut menurun, fungsi inhibisi fertilitas dari *Macaca radiata* tersebut juga kembali. Hal ini menunjukkan bahwa sifat inhibisi fertilitas dari EPPIN bersifat reversible.²³

Pemblokiran pada situs pengikatan SEMG1 memberikan dua konsekuensi. 1) SMG1 pada ejakulat yang tidak terikat Eppin dengan cepat dihidrolisis menjadi fragmen-fragmen kecil; tidak ada modulasi dari aktivitas PSA. 2) Anti-Eppin berikatan dengan Eppin pada permukaan spermatozoa dan meniru efek fisiologis yang mengatur motilitas spermatozoa dengan menghambat pengikatan SEMG1 pada permukaan spermatozoa, menyebabkan hilangnya motilitas, yang diamati pada semen dari jantan yang tidak subur. Konsekuensi kedua ini memprediksi bahwa penghilangan antibody anti-EPPIN dari permukaan spermatozoa akan memungkinkan spermatozoa memulihkan motilitasnya.²⁴ Antibodi anti-Eppin secara signifikan menurunkan velositas dan jarak tempuh spermatozoa.²³

Kontrasepsi menggunakan epitope antibody anti-EPPIN akan merusak jalur regulasi cAMP pada spermatozoa. Produksi cAMP oleh adenylcyclase membutuhkan HCO₃⁻ dan Ca²⁺, dan kehilangan kemampuan motilitas secara progresif berkorelasi langsung dengan kehilangan cAMP melalui inaktivasi dari gen *ADCY10*. Selain itu kerusakan dari gen yang terlibat dalam pertukaran ion Na²⁺ / H⁺ (Slc9a10) mempengaruhi motilitas dari spermatozoa. Pemberian anti-Eppin berkorelasi dengan komponen motilitas cAMP, Ca²⁺, dan pH. Antibodi anti-EPPIN juga dapat mengganggu pH intraseluler spermatozoa. Perubahan pH intraseluler ini disebabkan tidak adanya pertukaran antara Na⁺ / H⁺ pada spermatozoa dan akhirnya mengganggu motilitas atau pergerakan flagella. Selain itu, antibody terhadap EPPIN akan membuat semenogelin tidak dapat diurai oleh PSA dan tidak akan terjadi likuidifikasi spermatozoa sehingga motilitas spermatozoa akan terhambat. Pemberian antibody anti Eppin memiliki efek penghambatan motilitas dan mempercepat pergerakan spermatozoa akibat perubahan intraseluler seperti penurunan cAMP dan pH intraseluler yang membuat spermatozoa tidak dapat bergerak seperti biasa. Studi menggunakan spermatozoa manusia yang diberi antibody anti-Eppin memberikan hasil berupa peningkatan cAMP secara signifikan pada spermatozoa

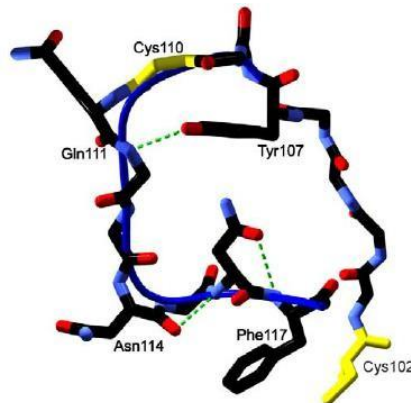
yang diberikan perlakuan. Oleh karena itu kehilangan motilitas secara progresif setelah diberi perlakuan anti-Eppin merupakan hasil dari adanya gangguan pada jalur cAMP, menyebabkan ketidakmampuan untuk menggunakan cAMP. Penurunan kadar cAMP ini menyebabkan penurunan dari masuknya ion Ca^{2+} .²⁵

2.3.2. Analisis epitop anti-EPPIN terhadap EPPIN

Antibodi yang dihasilkan oleh setiap kera infertile secara individual bersifat poliklonal dengan masing-masing antibodi mengenali epitope EPPIN yang sedikit berbeda namun memiliki epitope dominant yang sama.²³ Oleh karena itu uji tersebut dilanjutkan melakukan identifikasi epitope EPPIN mana yang bertanggung jawab memberikan efek kontrasepsi. Dari penelitian itu ditemukan 2 domain epitope yaitu, QGPGL-TDWLFPR di ujung N dan TCSMFVYGG-CQGNNNNFQ di ujung C. *Blocking* pada ujung N diketahui memiliki efek yang kecil terhadap motilitas dan pengikatan SEMG1, sedangkan *blocking* pada epitope di ujung C memiliki efek signifikan terhadap motilitas dan pengikatan SEMG1.²⁴ Berdasarkan analisis epitope anti-EPPIN terhadap EPPIN. O'Rand *et al.* (2006)²⁴ berhipotesis bahwa mekanisme kerja dari antibody anti-Eppin menyebabkan infertilitas pada kera jantan adalah dengan masuk ke cairan epididimus dan berikatan dengan Eppin pada permukaan spermatozoa dan memblokir situs pengikatan SEMG1. Berdasarkan analisis epitope anti-Eppin terhadap Eppin, O'Rand *et al.* (2006)²⁴ berhipotesis bahwa mekanisme kerja dari antibody anti-Eppin menyebabkan infertilitas pada kera jantan adalah dengan masuk ke cairan epididimus dan berikatan dengan Eppin pada permukaan spermatozoa dan memblokir situs pengikatan SEMG1.

Berdasarkan pemodelan 3D secara *in silico* diketahui bahwa terdapat 2 residu hidrofobik besar (Tyr107 dan Phe117) yang masing-masing berlokasi pada ujung N dan C dari suatu *loop* yang memiliki pengulangan residu asparagine (N113-N116)). Residu Tyr107 dan Phe117 bersifat sangat konserf di antara inhibitor protease lain yang mengandung domain Kunitz, termasuk jenis yang ekspresinya tinggi pada saluran reproduksi pria seperti EPPIN, WFDC6, WFDC8, SPINT3, SPINT4, dan SPINT5 (Gambar 5).²⁶ Silva *et al.* (2012) mempelajari apakah adanya mutasi titik pada salah satu gen yang mengkodekan asam amino tersebut dapat mempengaruhi pengikatan EPPIN dengan SEMG1 atau LTF dan hasilnya terdapat penurunan kemampuan pengikatan sebesar 70% jika dibandingkan dengan *wildtype* sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa kedua residu asam amino tersebut sangat terlibat terlibat dalam interaksi makromolekul dalam EPC. Residu Tyr107 dan Phe117 merupakan bagian dari epitope yang dikenali oleh antibody kontrasepsi pada kera jantan yang infertil. Bersama dengan *epitope-specific* antibody anti-EPPIN, S21C

(SMFVYGGCQGNNNNFQSANC), kedua residu menyebabkan efek inhibisi yang signifikan terhadap motilitas spermatozoa dengan meniru efek dari SEMG1 yang berikatan dengan EPPIN. Sekuen protein yang sifatnya konservatif memiliki rantai samping residu asam amino seperti fenilalanin (Phe 117) yang umumnya dikenal sebagai *protein binding hot spots* dan kemungkinan besar merupakan permukaan dari interaksi protein-protein dan merupakan target potensial untuk pengembangan obat. Oleh karena itu, dari tersebut ditunjukkan bahwa penghambat motilitas spermatozoa baru yang secara selektif mengikat residu EPPIN Cys102, Tyr107, dan Phe117 dapat dikembangkan sebagai obat kontrasepsi pria yang potensial.¹⁴



Gambar 5. *In silico model* yang menggambarkan residu-residu pada epitope EPPIN.²⁶

Langkah selanjutnya dalam mengembangkan EPPIN sebagai target kontrasepsi pria adalah dengan mengoptimasi komponen utama yang memiliki sifat fisik (kelarutan, *lipophilicity*, dan massa molekuler) yang diprediksi dapat menembus sel dan bersifat bioavailability. Komponen tersebut harus memiliki potensi dan selektivitas terhadap efek toksisitas dan melewati fase 1 dari uji klinis. Agar dapat diterima oleh masyarakat, metode penggunaan dari kontrasepsi pria juga harus diperhatikan. Bentuk oral adalah bentuk yang paling dipilih dan akan menjadi aspek penting dalam perkembangan alat kontrasepsi pria.¹ Saat ini sedang dikembangkan senyawa organik yang memiliki fungsi yang sama dengan antibody anti-EPPIN yang mampu memblokir tempat pengikatan semenogelin. Ikatan antara SEMG-EPPIN penting untuk spermatozoa mendapatkan motilitasnya dan kemampuan untuk memfertilisasi telur.²⁵ Dengan mengganggu interaksi ini, diharapkan senyawa organik tersebut dapat mempertahankan spermatozoa dalam keadaan non-motil sehingga akhirnya dapat bekerja sebagai agen kontrasepsi. Target molekuler dari EPPIN hanya dapat ditemukan pada saluran reproduksi pria sehingga merupakan target yang spesifik. Senyawa obat yang menargetkan EPPIN diharapkan dapat memberikan efek sistemik minimum terhadap organ tubuh yang lain. Hal ini juga yang mendasari pengembangan kontrasepsi non-hormonal sebagai alternatif kontrasepsi hormonal karena efeknya yang kecil terhadap produksi spermatozoa atau berbagai fungsi lainnya yang bersifat *hormone dependent*.

BAB 3

SIMPULAN

Kontrasepsi non-hormonal merupakan salah satu alternatif kontrasepsi pada pria selain vasektomi dan kondom yang saat ini paling sering digunakan. Kontrasepsi non-hormonal menargetkan protein yang terlibat dalam fertilitas pria di luar hormon. Salah satu protein non-hormonal yang ditargetkan untuk menjadi kontrasepsi pria adalah EPPIN, suatu protein yang menyelubungi permukaan spermatozoa dan mampu berikatan dengan seminogelin untuk meregulasi motilitas spermatozoa. Jika pengikatan antara kompleks EPPIN dengan seminogelin dihambat, maka dengan cepat seminogelin akan dihidrolisis oleh PSA menjadi fragmen-fragmen kecil yang menyebabkan spermatozoa menjadi imotil. EPPIN spesifik dihasilkan di organ testis dan epididimis dari organ reproduksi pria dan memiliki fungsi yang penting untuk ejakulasi spermatozoa. Fungsi tersebut dapat diblok secara reversible karena kemudahan akses dalam menargetkan permukaan spermatozoa. Saat ini percobaan menargetkan EPPIN sebagai kontrasepsi pria dilakukan pada kera *Macaca radiata* dengan memvaksinasi kera jantan tersebut dengan anti-EPPIN dengan tujuan dihasilkan antibody yang dapat berikatan dengan EPPIN sehingga pengikatan antara EPPIN-SEMG1 tidak terjadi, dan dengan mencari residu asam amino pada epitope EPPIN yang bisa mengganggu afinitas pengikatan EPPIN-SEMG1. Studi-studi tersebut memberikan hasil yang menjanjikan sehingga kedepannya dapat dikembangkan suatu bahan aktif yang bekerja dengan mekanisme tersebut dan berpotensi untuk dijadikan alternatif kontrasepsi pria.

DAFTAR PUSTAKA

1. Page ST, Amory JK, Bremner WJ. Advances in male contraception [Internet]. Vol. 29, Endocrine Reviews. The Endocrine Society; 2008 [cited 2021 May 18]. p. 465–93. Available from: [/pmc/articles/PMC2528850/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2528850/)
2. Sipilä P, Jalkanen J, Huhtaniemi IT, Poutanen M. Novel epididymal proteins as targets for the development of post-testicular male contraception. Vol. 137, Reproduction. 2009. p. 379–89.
3. Long JE, Lee MS, Blithe DL. Male contraceptive development: Update on novel hormonal and nonhormonal methods [Internet]. Vol. 65, Clinical Chemistry. American Association for Clinical Chemistry Inc.; 2019 [cited 2021 May 15]. p. 153–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30602479/>
4. Richardson RT, Sivashanmugam P, Hall SH, Hamil KG, Moore PA, Ruben SM, et al. Cloning and sequencing of human Eppin: A novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. Gene. 2001 May 30;270(1–2):93–102.
5. Kent K, Johnston M, Strump N, Garcia TX. Toward Development of the Male Pill: A Decade of Potential Non-hormonal Contraceptive Targets [Internet]. Vol. 8, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 May 16]. p. 61. Available from: www.frontiersin.org
6. Lishko P V. Contraception: Search for an Ideal Unisex Mechanism by Targeting Ion Channels HHS Public Access. Trends Biochem Sci [Internet]. 2016 [cited 2021 May 17];41(10):816–8. Available from: <http://grants.nih.gov/grants/guide/rfa-files/RFA->
7. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1993 Dec 1 [cited 2021 May 26];90(23):11162–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8248223/>
8. Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Gödecke S, Birchmeier C. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. Genes Dev [Internet]. 1996 May 15 [cited 2021 May 26];10(10):1184–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8675006/>
9. Drevet JR. Epididymal approaches to male contraception. Basic Clin Androl [Internet]. 2018 Nov 6 [cited 2021 May 15];28(1):1–13. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s12610-018-0078-y>
10. O'rand MG, Widgren EE, Hamil KG, Silva EJ, Richardson RT. Epididymal protein targets: A review brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive. Vol. 32, Journal of Andrology. 2011. p. 698–704.
11. Koyama K, Hasegawa A, Komori S. Functional aspects of CD52 in reproduction. J Reprod Immunol. 2009 Jan;83(1–2):56–9.
12. Sullivan R, Mieusset R. The human epididymis: Its function in sperm maturation. Hum Reprod Update [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 May 25];22(5):574–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27307387/>
13. Hill SC, Youde SJ, Man S, Teale GR, Baxendale AJ, Hislop A, et al. Activation of CD40 in Cervical Carcinoma Cells Facilitates CTL Responses and Augments Chemotherapy-Induced Apoptosis. J Immunol. 2005;174(1):41–50.

14. Silva EJR, Hamil KG, O'Rand MG. Interacting proteins on human spermatozoa: Adaptive evolution of the binding of semenogelin I to EPPIN. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 2 [cited 2021 May 25];8(12):82014. Available from: www.plosone.org
15. O'Rand MG, Silva EJR, Hamil KG. Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive [Internet]. Vol. 157, *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc.; 2016 [cited 2021 Apr 25]. p. 105–11. Available from: [/pmc/articles/PMC4703502/](http://pmc/articles/PMC4703502/)
16. Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugam P, Wang Z, O'Rand MG, French FS, et al. Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biol Reprod*. 2004 Nov;71(5):1484–90.
17. O'Rand MG, Widgren EE, Wang Z, Richardson RT. Eppin: an epididymal protease inhibitor and a target for male contraception. [Internet]. Vol. 63, *Society of Reproduction and Fertility supplement. Soc Reprod Fertil Suppl*; 2007 [cited 2021 May 16]. p. 445–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17566290/>
18. Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2009 [cited 2021 May 25];15(2):213–27. Available from: [/pmc/articles/PMC2639084/](http://pmc/articles/PMC2639084/)
19. Clauss A, Lilja H, Lundwall Å. A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *Biochem J* [Internet]. 2002 Nov 15 [cited 2021 May 25];368(1):233–42. Available from: www.expasy.ch
20. Zhang X, Fang J, Xu B, Zhang S, Su S, Song Z, et al. Correlation of epididymal protease inhibitor and fibronectin in human semen. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 16 [cited 2021 May 25];8(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358212/>
21. Zhang X, Fang J, Xu B, Zhang S, Su S, Song Z, et al. Correlation of epididymal protease inhibitor and fibronectin in human semen. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 16 [cited 2021 May 16];8(12). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24358212/>
22. McCrudden MTC, Dafforn TR, Houston DF, Turkington PT, Timson DJ. Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. *FEBS J* [Internet]. 2008 Apr [cited 2021 May 16];275(8):1742–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18331357/>
23. O'Rand MG, Widgren EE, Sivashanmugam P, Richardson RT, Hall SH, French FS, et al. Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with Eppin. *Science* (80-) [Internet]. 2004 Nov 12 [cited 2021 May 25];306(5699):1189–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15539605/>
24. O'Rand MG, Widgren EE, Wang Z, Richardson RT. Eppin: An effective target for male contraception. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 May 16;250(1–2):157–62.
25. O'Rand MG, Widgren EE, Beyler S, Richardson RT. Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: Effect on cyclic adenosine monophosphate. *Biol Reprod*. 2009 Feb;80(2):279–85.
26. Silva EJR, Hamil KG, Richardson RT, O'Rand MG. Characterization of EPPIN's semenogelin i binding site: A contraceptive drug target. *Biol Reprod* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2021 May 26];87(3):1–8. Available from: [/pmc/articles/PMC3463412/](http://pmc/articles/PMC3463412/)