



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PEMERIKSAAN MIKRODELESI KROMOSOM Y  
PADA PRIA OLIGOZOOSPERMIA  
MENGUNAKAN *SEQUENCE-TAGGED SITES*  
sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, DAN sY255  
DI JAKARTA  
PADA BULAN MEI 2007 HINGGA NOVEMBER 2008**

**SKRIPSI**

**David Andi Wijaya  
NPM 0105000476**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER UMUM  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA, JUNI 2009**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PEMERIKSAAN MIKRODELESI KROMOSOM Y  
PADA PRIA OLIGOZOOSPERMIA  
MENGUNAKAN *SEQUENCE-TAGGED SITES*  
sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, DAN sY255  
DI JAKARTA  
PADA BULAN MEI 2007 HINGGA NOVEMBER 2008**

**SKRIPSI**

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan  
Program Pendidikan Dokter Umum  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**David Andi Wijaya  
NPM 0105000476**

**PROGRAM PENDIDIKAN DOKTER UMUM  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS INDONESIA  
JAKARTA, JUNI 2009**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Skripsi ini adalah hasil karya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

**Nama : David Andi Wijaya**

**NPM : 0105000476**

**Tanda Tangan :**

**Tanggal : 16 Juni 2009**

## HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh:

Nama : David Andi Wijaya

NPM : 0105000476

Program Studi : Kedokteran Umum

Judul Skripsi:

**PEMERIKSAAN MIKRODELESI KROMOSOM Y  
PADA PRIA OLIGOZOOSPERMIA  
MENGUNAKAN *SEQUENCE-TAGGED SITES*  
sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, DAN sY255  
DI JAKARTA PADA BULAN MEI 2007 HINGGA NOVEMBER 2008**

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian dari persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar sarjana pada

**Program Pendidikan Dokter Umum  
Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M. Biomed. ( )

Penguji : Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M. Biomed. ( )

Penguji : Dra. Ary Estuningtyas, MS. ( )

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : 16 Juni 2009

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, karena atas berkat dan rahmatNya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Penyusunan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Kedokteran Program Pendidikan Dokter Umum pada Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, baik dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Pembimbing riset, Dr. Dra. Dwi Anita Suryandari, M. Biomed.
2. Teman-teman kelompok riset yang telah sedemikian antusias dan kooperatif dalam bekerjasama sehingga riset ini akhirnya dapat selesai tepat waktu.
3. Kedua orang tua saya yang telah mencurahkan kasih sayang yang begitu besarnya.

Akhir kata, penulis berharap Tuhan Yang Maha Esa berkenan membalas segala kebaikan saudara-saudara semua. Dan semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Salemba, 8 Juni 2009

Penulis

**LEMBAR PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
KARYA ILMIAH UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya bertanda tangan dibawah ini:

Nama : David Andi Wijaya  
NPM : 0105000476  
Program Studi : Pendidikan Dokter Umum  
Fakultas : Kedokteran  
Jenis Karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Inexclusive Royalty free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**PEMERIKSAAN MIKRODELESI KROMOSOM Y  
PADA PRIA OLIGOZOOSPERMIA  
MENGUNAKAN *SEQUENCE-TAGGED SITES*  
sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, DAN sY255  
DI JAKARTA PADA BULAN MEI 2007 HINGGA NOVEMBER 2008**

Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelolanya dalam bentuk pangkalan data (*database*), mendistribusikannya, dan menampilkan/mempublikasikannya di internet atau media lain untuk kepentingan akademis tanpa perlu meminta izin dari saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik hak cipta. Segala bentuk tuntutan hukum yang timbul atas pelanggaran hak cipta dalam karya ilmiah ini menjadi tanggung jawab saya pribadi.

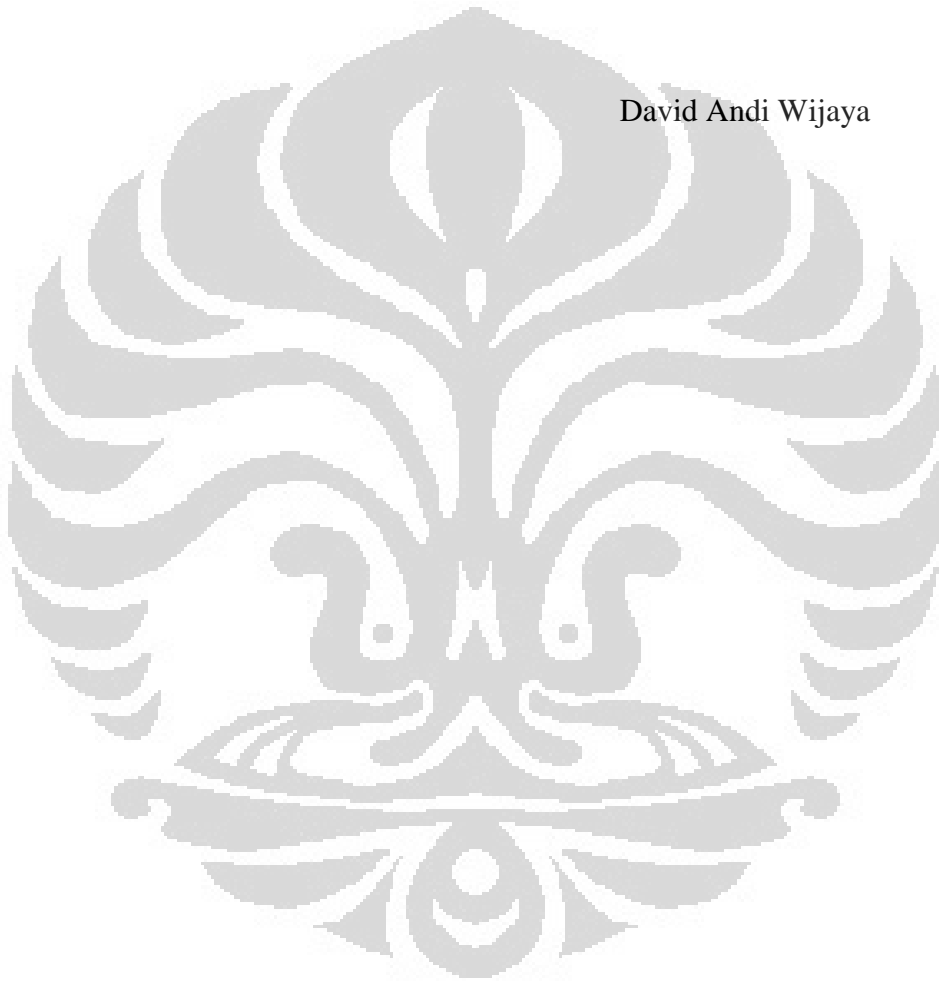
Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya.

Dibuat di : Jakarta

Pada tanggal : 8 Juni 2009

Yang menyatakan

David Andi Wijaya



## ABSTRAK

Nama : David Andi Wijaya

Program Studi : Kedokteran Umum

Judul :

PEMERIKSAAN MIKRODELESI KROMOSOM Y PADA PRIA OLIGOZOOSPERMIA MENGGUNAKAN *SEQUENCED TAGGED SITES* sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, DAN sY255 DI JAKARTA PADA MEI 2007 HINGGA NOVEMBER 2008

Sebanyak 15% persen pasangan mengalami kemandulan. Sebanyak 30% di antaranya disebabkan oleh faktor pria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kekerapan mikordelesi kromosom Y dan mengetahui mikordelesi kandidat gen mana pada kromosom Y yang paling sering dijumpai pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta 2007 – 2008. Penelitian ini menggunakan desain penelitian bentuk deskriptif molekuler *cross sectional*. Besarnya sampel pria infertil dengan kriteria oligozoospermia berat yang akan diteliti sebanyak 50 orang. Dari penelitian ini didapatkan gen yang paling sering mengalami mikordelesi pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta 2007 – 2008 adalah gen pada regio sY254 dan sY255 kromosom Y.

Kata kunci:

infertilitas, oligozoospermia, mikordelesi, kromosom Y, sY254, sY255.



## ABSTRACT

Name : David Andi Wijaya

Program : Medical Doctor

Title :

Y CHROMOSOME MICRODELETION DETECTION IN OLIGOZOOSPERMIA MALE USING sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, AND sY255 SEQUENCED-TAGGED SITES IN JAKARTA FROM MEI 2007 UNTIL NOVEMBER 2008

As many as 15% couples have an infertility problem. 30% problems among them are caused by male factor. This research is objected to measure the Y chromosome microdeletion frequency and to know the gen candidate of Y chromosome with the highest frequency among oligozoospermia patient in Jakarta from 2007 until 2008. This research uses cross sectional molecular descriptive design. From this research, we can conclude that the genes with the highest microdeletion frequency in oligozoospermia patient in Jakarta from 2007 until 2008 are genes in sY254 and sY255 region of Y chromosome.

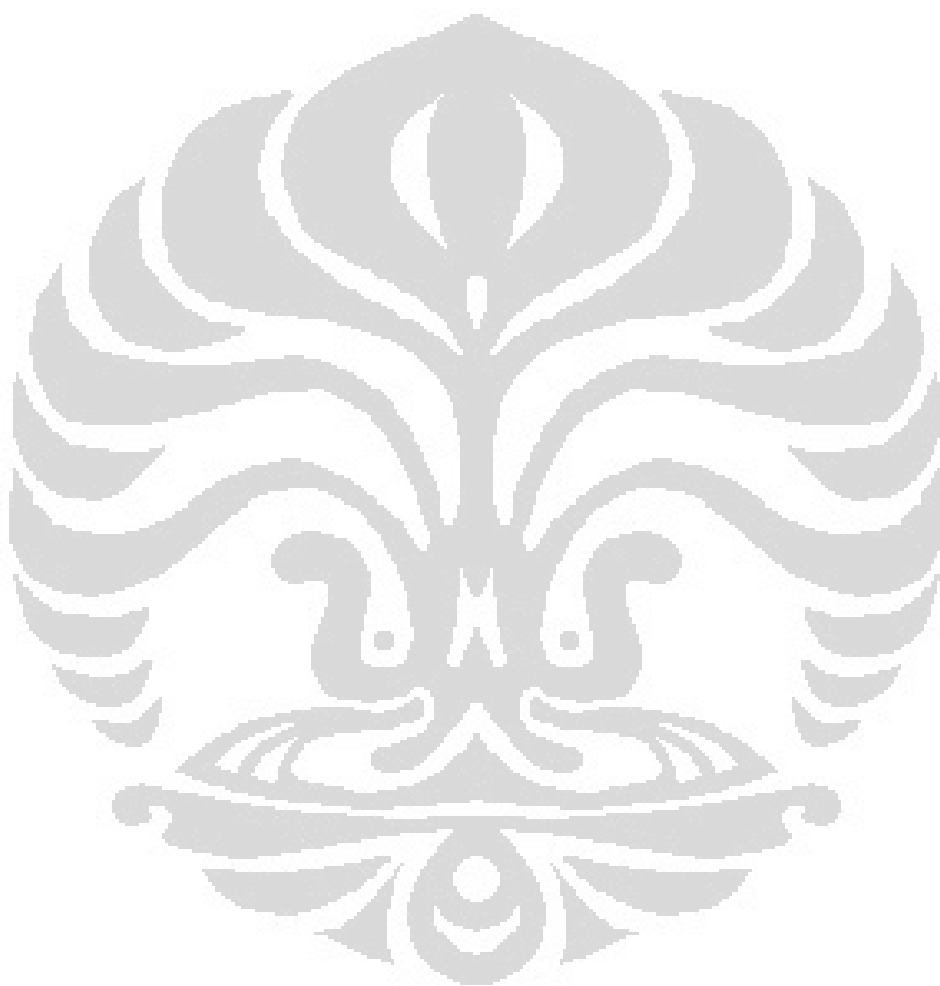
Keywords:

*infertility, oligozoospermia, microdeletion, Y chromosome, sY254, sY255*

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR JUDUL .....	ii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH .....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN .....	xv
<b>1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	2
1.4 Manfaat .....	2
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>4</b>
2.1 Spermatogenesis .....	4
2.2 Infertilitas .....	6
2.3 Kromosom Y .....	9
2.4 Azoospermia Factor .....	12
2.5 Pemrosesan DNA .....	18
2.6 Terapi Gen .....	21
<b>3. METODOLOGI PENELITIAN .....</b>	<b>22</b>
3.1 Desain Penelitian .....	22
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian .....	22
3.3 Kriteria Sampel .....	22
3.4 Besar Sampel .....	22
3.5 Cara Kerja .....	23
3.6 Etika Penelitian .....	27
<b>4. HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>28</b>
4.1 Hasil Analisis Semen dan Pemeriksaan dengan STS.....	28
4.2 Analisis Data .....	32
<b>5. PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
<b>6. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>37</b>
6.1 Kesimpulan .....	37

6.2 Saran .....	37
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>38</b>
<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>40</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perbandingan karakteristik gen-gen kandidat AZF: DAZ, RBMY, USP9Y, dan DBY .....	18
Tabel 3.1	Urutan sekuens dari STS uji yang digunakan dalam penelitian ini .....	24
Tabel 3.2	Bahan Campuran PCR .....	25
Tabel 3.3	Suhu denaturasi, annealing, dan ekstensi masing-masing STS .....	26
Tabel 4.1	Data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada kelompok pria normozoospermia .....	28
Tabel 4.2	Data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada kelompok pria oligozoospermia berat (<5 juta spermatozoa/ml). .....	29
Tabel 4.3	Data hasil pemeriksaan STS pada kelompok wanita yang memiliki anak.....	31



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Tahapan-tahapan proses spermatogenesis.....	4
Gambar 2.2	Penghitungan jumlah spermatozoa pada analisis semen.....	8
Gambar 2.2	Penggambaran skematik kromosom Y.....	10
Gambar 2.3	a. pemetaan kromosom Y dengan <i>cytological band</i> b. pemetaan 7 interval kromosom Y menurut Vergnaud c. pemetaan 43 interval kromosom Y menurut Vollrath .....	11
Gambar 2.3	a. pemetaan kromosom Y dengan <i>cytological band</i> b. pemetaan 7 interval kromosom Y menurut Vergnaud c. pemetaan 43 interval kromosom Y menurut Vollrath .....	13
Gambar 2.6	Regio AZFa dan interval Sxr <sup>b</sup> : a. Regio AZFa terdiri atas dua <i>contig</i> yang tidak saling bertumpang tindih. b. 10 klon yang bertumpang tindih sepanjang regio AZFa c. Letak 3 gen bila diperbandingkan dengan letak klon yang ada. d. Peta transkripsi Sxr <sup>b</sup> pada tikus, yang menunjukkan homologi dengan interval AZFa.....	14
Gambar 2.7	Struktur genomik gen RBMY1 .....	15
Gambar 2.8	Struktur genomik gen DAZ dan proteinnya .....	16
Gambar 2.9	Ilustrasi langkah-langkah pembuatan gel agarose.....	20
Gambar 2.10	Contoh hasil elektroforesis.....	21

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK .....	40
Lampiran 2	SURAT PERNYATAAN PERSETUJUAN TINDAKAN MEDIK .....	41



## DAFTAR SINGKATAN

ATP	<i>adenosin triphosphate</i>
AZF	<i>azoospermic factor</i>
BAC	<i>bacterial artificial chromosome</i>
DAZ	<i>deleted in azoospermia</i>
DBY	<i>dead box on the Y</i>
DFFRY	<i>drosophila fat faces related Y</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
NRY	<i>nonrecombining region of the Y chromosome</i>
PARs	<i>pseudoautosomal regions</i>
pb	<i>pasang basa</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RBMV	<i>RNA binding motif on the Y</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SRY	<i>the sex determining region on Y</i>
STS	<i>sequence-tagged site</i>
USP9Y	<i>ubiquitin specific protease 9 Y</i>
UTY	<i>ubiquitous TPR motif on the Y</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YAC	<i>yeast artificial chromosome</i>
YRRM	<i>Y-specific RNA recognition motif</i>

# BAB 1

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Salah satu ciri penting makhluk hidup adalah kemampuan untuk bereproduksi. Ketidakmampuan bereproduksi disebut infertilitas, dinyatakan sebagai tidak terjadinya kehamilan setelah satu tahun perkawinan dengan hubungan seksual normal tanpa upaya untuk mencegah kehamilan.<sup>1</sup> Sekitar 15% pasangan memenuhi kriteria infertil, 35% disebabkan oleh faktor wanita, 30% oleh faktor pria, 20% oleh kombinasi faktor wanita dan faktor pria, dan 15% idiopatik.<sup>1,2</sup>

Kemandulan pada pria disebabkan oleh faktor lingkungan dan faktor genetik. Faktor genetik yang mempengaruhi kemandulan berupa kelainan genetik, baik satu gen (monogen) atau merupakan kerja sama lebih dari satu gen (poligen). Gen yang mempengaruhi kemandulan pada pria antara lain gen SRY yang terletak pada lengan pendek kromosom Y (Yp) dan gen AZF (*azoospermic factor*) yang terletak pada lengan panjang (Yq11) kromosom Y.<sup>3-6</sup>

Regio Yq11 terdiri dari 76 lokus gen dan dibagi ke dalam 25 interval (D1-25). Mutasi sering terjadi pada regio proksimal (D3-6) yang selanjutnya dinamakan AZFa, bagian tengah (D13-16) yang selanjutnya dinamakan AZFb, dan bagian distal (D20-25) yang selanjutnya dinamakan AZFc. Masing-masing regio memiliki kandidat gen khusus dalam spermatogenesis.<sup>7</sup> Manifestasi klinis yang diperlihatkan akibat adanya delesi pada ketiga daerah AZF sangat bervariasi, mulai dari *spermatogenic arrest* pada tahap pembentukan spermatosit sekunder, hingga sindroma sel Sertoli tipe I dan sindrom sel Sertoli tipe II.

Penelitian yang telah dilakukan di beberapa negara memperlihatkan adanya perbedaan kekerapan dan kandidat gen yang mengalami delesi. Hal ini menunjukkan bahwa mikrodeselesi kromosom Y dipengaruhi oleh perbedaan ras atau etnik. Oleh karena itu, di Indonesia juga perlu dilakukan pemeriksaan sehingga dapat diketahui berapa besar kekerapan terjadinya mikrodeselesi kromosom Y dan kandidat gen yang paling banyak mengalami delesi.

### 1.2 Rumusan Masalah



1. Berapa kekerapan mikrodlesi kromosom Y pada pria penderita oligozoospermia berat di Jakarta?
2. Mikrodlesi pada kandidat gen kromosom Y mana yang paling banyak dijumpai pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Tujuan umum penelitian ini adalah mendapatkan suatu alat diagnostik genetik untuk infertilitas pada pria Indonesia.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Mengetahui kekerapan mikrodlesi kromosom Y pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta tahun 2007 – 2008.
2. Mengetahui mikrodlesi kandidat gen mana pada kromosom Y yang paling sering dijumpai pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta 2007 – 2008.

### **1.4 Manfaat**

#### **1.4.1 Manfaat Bagi Peneliti**

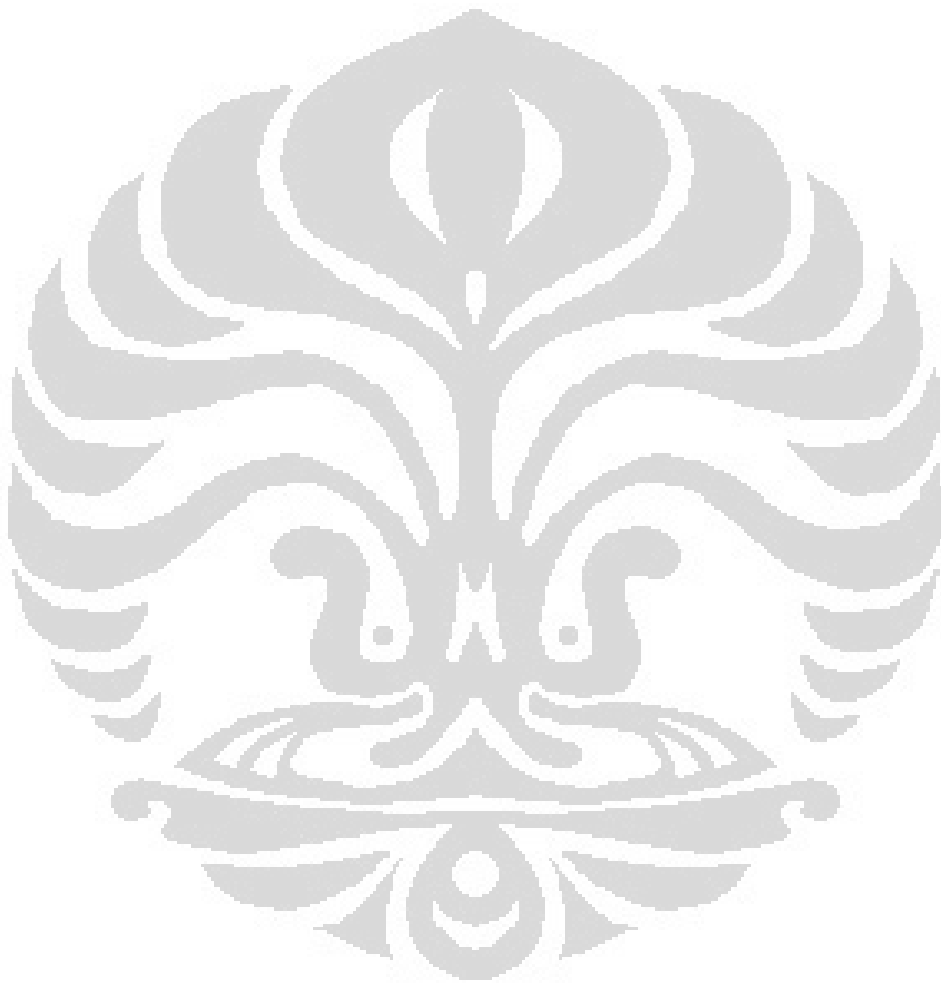
1. Menambah pengetahuan dan pengalaman peneliti di bidang biologi molekuler khususnya mengenai mikrodlesi kromosom Y pada pria penderita oligozoospermia di Jakarta.
2. Memenuhi syarat untuk menerima gelar Sarjana Kedokteran.

#### **1.4.2 Manfaat Bagi Masyarakat**

1. Jika penelitian ini memperoleh hasil yang signifikan, pemeriksaan mikrodlesi kromosom Y dapat dijadikan alat diagnostik genetik infertilitas pada pria Indonesia.
2. Mengurangi biaya masyarakat yang selama ini terbuang sia-sia untuk diagnosis dan pengobatan. Pria yang telah dipastikan mengalami mikrodlesi pada kromosom Y tidak memerlukan pemeriksaan biopsi testis, maupun terapi hormonal untuk merangsang spermatogenesisnya

karena pria tersebut telah kehilangan gen yang mengontrol proses spermatogenesisnya.

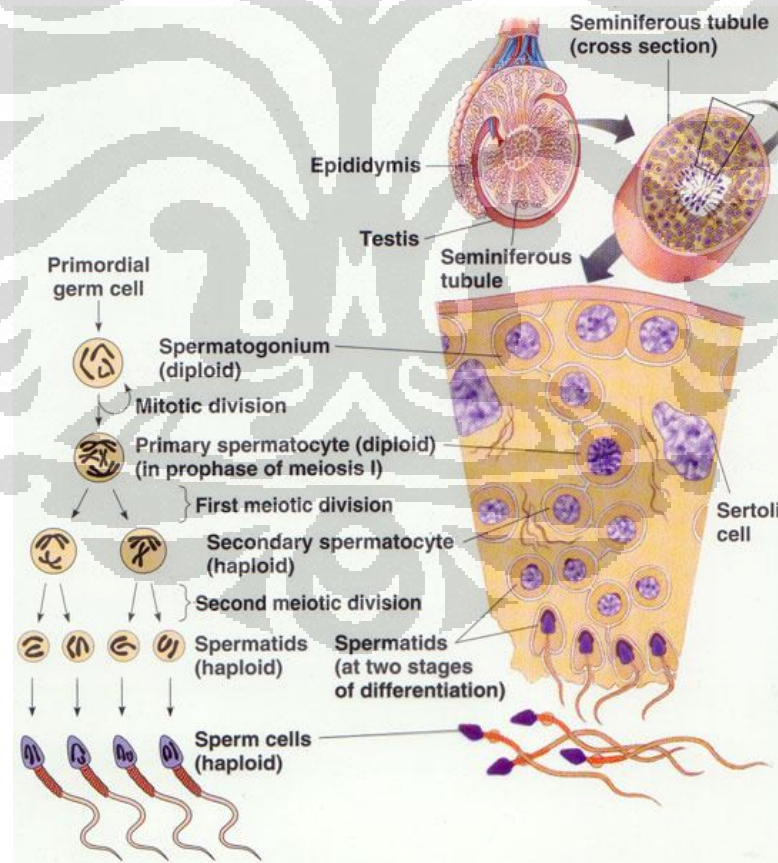
3. Membantu proses konseling untuk memberi penjelasan pewarisan kelainan genetik pada anak laki-laki dari pria yang telah dipastikan mengalami mikrodelesi pada kromosom Y yang hendak memperoleh anak dengan cara bayi tabung.



## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Spermatogenesis

Spermatogenesis adalah suatu proses kompleks di mana sel germinal yang relatif belum berdiferensiasi berproliferasi dan diubah menjadi spermatozoa yang terspesialisasi dan motil, yang masing-masingnya mengandung satu set 23 kromosom yang haploid.<sup>8</sup> Proses spermatogenesis terjadi di dalam tubulus seminiferus, yang pada dindingnya mengandung banyak sel-sel germinal dan sel-sel sertoli. Satu siklus spermatogenesis terdiri atas tiga fase, yaitu: spermatositogenesis, spermatidogenesis, dan spermiogenesis; dan memerlukan waktu enam puluh empat hari.<sup>8</sup>



Gambar 2.1 Tahapan-tahapan proses spermatogenesis.

#### 2.1.1 Spermatositogenesis

Spermatositogenesis merupakan tahapan perkembangan dari spermatogonia sampai spermatosit sekunder. Spermatogonia yang terletak di lapisan tubulus terluar terus-menerus membelah secara mitosis untuk menghasilkan sel anak yang identik dengan sel induknya. Proliferasi tersebut menyediakan persediaan sel germinal baru yang cukup. Setelah pembelahan mitosis, satu dari sel anak tetap berada di bagian terluar tubul dan bertahan sebagai spermatogonium yang tidak berdiferensiasi, yang berfungsi untuk menjaga keberadaan sel-sel germinal. Sel-sel anak lainnya mulai bergerak menuju lumen sambil menjalani berbagai proses. Pada manusia, sel-sel tersebut akan membelah secara mitosis sebanyak dua kali untuk membentuk spermatosit primer yang identik.<sup>8</sup>

Setelah proses mitotik yang terakhir, spermatosit primer akan memasuki fase istirahat. Pada fase ini, kromosom diduplikasikan dan DNA bersiap memasuki pembelahan meiosis yang pertama. Pada meiosis tahap pertama, setiap spermatosit primer membentuk dua spermatosit sekunder (masing-masing dengan 23 pasang kromosom haploid).<sup>8</sup>

### 2.1.2 Spermatidogenesis

Spermatidogenesis merupakan tahapan pembentukan spermatid dari spermatosit sekunder. Setelah pembelahan meiosis tahap pertama, spermatosit sekunder akan memasuki pembelahan meiosis tahap kedua hingga akhirnya terbentuk 4 buah spermatid dari 1 spermatogonia.<sup>8</sup>

### 2.1.3 Spermiosis dan Spermiogenesis

Spermiosis merupakan pembentukan spermatozoa dari spermatid. Setelah itu, spermatozoa akan mengalami *remodelling* lagi dalam proses yang disebut spermiogenesis. Proses spermiogenesis tersebut merupakan proses pembentukan spermatozoa yang matur, yakni spermatozoa yang memiliki 4 bagian, yaitu: kepala, akrosom, *midpiece*, dan ekor. Kepala berisi nukleus yang mengandung akrosom, vesikel yang berisi enzim yang melapisi bagian ujung kepala untuk melakukan penetrasi pada ovum. Ekor berfungsi untuk bergerak, yang ditenagai oleh mitokondria yang terletak pada bagian *midpiece*.<sup>8</sup>

Sampai proses pematangan sperma selesai, sel-sel germinal yang muncul dari satu spermatosit primer tetap terhubung dengan jembatan sitoplasmik. Hubungan ini penting karena sperma yang tidak mendapatkan kromosom X yang mengandung gen untuk produk-produk seluler yang penting untuk perkembangan sperma (kromosom X yang berukuran besar mengandung beberapa ribu gen, sementara kromosom Y hanya memiliki beberapa lusin dengan gen SRY yang merupakan gen paling penting dan beberapa gen lainnya yang penting untuk fertilitas pada pria).<sup>8</sup>

#### **2.1.4 Peran Sel Sertoli dalam Spermatogenesis**

Selama proses spermatogenesis, sel sertoli berperan sebagai sawar darah testis yang mencegah antibodi mencapai sel-sel germinal yang mengalami diferensiasi. Sel sertoli juga menghasilkan cairan testis, substansi yang menginisiasi meiosis, inhibin, protein pengikat androgen, serta hormon antimullerian.<sup>8</sup>

#### **2.1.5 Kontrol Hormonal Spermatogenesis**

Spermatogenesis terjadi akibat interaksi hipotalamus, hipofisis, dan sel leydig. Hipotalamus menghasilkan *Gonadotropin releasing hormone* (GnRH), menyebabkan hipofisis anterior menghasilkan *Follicle stimulating hormone* (FSH) dan *Luteinizing hormone* (LH). FSH meningkatkan aktivitas sel Sertoli sementara LH mengakibatkan sel Leydig menghasilkan testosteron, keduanya meningkatkan laju spermatogenesis. Inhibin yang dihasilkan sel Sertoli mengurangi produksi FSH hipofisis anterior. Sementara testosteron, selain meningkatkan laju negatif, juga mengurangi produksi LH hipofisis anterior dan mengurangi produksi GnRH hipotalamus.<sup>8</sup>

## **2.2 Infertilitas**

Infertilitas adalah ketidakmampuan untuk mencapai kehamilan setelah satu tahun hubungan seksual normal tanpa upaya untuk mencegah kehamilan.<sup>1</sup> Terdapat sekitar 15% pasangan yang memenuhi kriteria infertil tersebut. Dari pasangan yang infertil tersebut 35% disebabkan oleh faktor wanita, 30% oleh faktor pria,

20% oleh kombinasi faktor wanita dan faktor pria, dan 15% tanpa sebab yang jelas.<sup>1,2</sup>

### **2.2.1 Infertilitas pada Pria**

Penyebab infertilitas pada pria dapat dibagi menjadi 3, yakni penyebab pretestikuler, penyebab testikuler, dan penyebab pascatestikuler. Penyebab pretestikuler dapat berupa gangguan pada aksis hipotalamus-hipofisis atau gangguan organ perifer yang mengganggu keseimbangan hormonal tubuh.<sup>9,10</sup>

Penyebab testikuler dapat berupa gangguan kualitas semen, gangguan genetik pada kromosom Y, dan gangguan struktural pada testis karena trauma, infeksi, ataupun neoplasma.<sup>9</sup> Buruknya kualitas semen dapat diklasifikasikan lagi menjadi beberapa jenis, yakni oligozoospermia, asthenozoospermia, teratozoospermia, azoospermia, aspermia, dan oligoasthenoteratozoospermia.<sup>11</sup>

Oligozoospermia merupakan suatu keadaan konsentrasi sperma kurang dari nilai referensi. Asthenozoospermia merupakan suatu keadaan motilitas sperma kurang dari nilai referensi. Teratozoospermia merupakan suatu keadaan morfologi sperma yang kurang dari nilai referensi. Sementara oligoasthenoteratozoospermia merupakan suatu keadaan kombinasi dari ketiga kelainan yang disebut sebelumnya. Azoospermia merupakan suatu keadaan di mana pada ejakulat sama sekali tidak terdapat spermatozoa. Sementara, aspermia merupakan suatu keadaan di mana ejakulat tidak terdapat sama sekali spermatozoa.<sup>11</sup>

Sementara penyebab pascatestikuler dapat berupa gangguan saluran keluar ejakulat ataupun gangguan kemampuan ejakulasi. Pemeriksaan penunjang untuk membantu menegakkan diagnosis infertilitas pada pria adalah analisis semen, pemeriksaan darah tepi untuk menilai kadar hormon dan keadaan kromosom Y.<sup>9</sup> Karena penelitian ini berhubungan dengan hanya pria yang mengalami oligozoospermia dan azoospermia, penulis hanya mengkhususkan penguraian lebih dalam mengenai untuk oligozoospermia dan azoospermia.

### **2.2.2 Analisis Semen**

Analisis semen merupakan pemeriksaan terhadap karakter semen dan spermatozoa yang terkandung didalam cairan ejakulat. Untuk menegakkan diagnosis awal dan juga untuk menentukan terapi yang tepat pada pria infertil maka perlu dilakukan analisis semen sesuai dengan kriteria WHO. Pengambilan cairan semen dan analisisnya harus dilakukan sesuai dengan prosedur yang standar oleh laboran yang telah terakreditasi.



Gambar 2.2 Penghitungan jumlah spermatozoa pada analisis semen (diunduh dari: <http://www.fertilitycenter-crete.gr>).

Pemeriksaan semen dibagi menjadi tiga bagian yaitu pemeriksaan makroskopik, pemeriksaan mikroskopik, dan pemeriksaan tambahan. Pemeriksaan makroskopik termasuk di dalamnya yaitu likuifaksi, warna, bau, pH, volume, dan viskositas. Sedangkan yang dimaksud dengan pemeriksaan mikroskopik adalah pemeriksaan dari spermatozoa yang terdapat di dalam semen. Yang dinilai pada pemeriksaan mikroskopik adalah kecepatan rata-rata sperma, motilitas, konsentrasi, jumlah sperma total, viabilitas sperma, morfologi sperma normal, aglutinasi spontan, autoaglutinasi, elemen lain bukan sperma (leukosit, eritrosit, epitel), dan uji integritas membran (HOS test).<sup>11</sup>

### 2.2.3 Konsentrasi Spermatozoa

Berdasarkan panduan dari WHO, nilai referensi normal untuk konsentrasi spermatozoa adalah 20 juta spermatozoa/ml.<sup>11</sup> Dengan demikian, normozoospermia adalah suatu keadaan nilai konsentrasi spermatozoa lebih dari 20 juta spermatozoa/ml, dan oligozoospermia adalah suatu keadaan konsentrasi spermatozoa kurang dari 20 juta spermatozoa/ml. Beberapa peneliti lain membuat entitas sendiri untuk memperjelas kriteria WHO tadi, yaitu oligozoospermia berat. Oligozoospermia adalah keadaan di mana konsentrasi spermatozoa di antara 5 juta spermatozoa/ml sampai < 20 juta spermatozoa/ml.<sup>7,13</sup> Sementara, oligozoospermia berat adalah keadaan di mana konsentrasi spermatozoa < 5 juta spermatozoa/ml.<sup>7,12,13</sup>

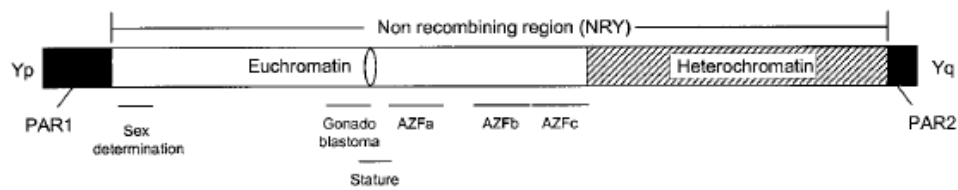
Berkurangnya konsentrasi sel sperma dapat disebabkan oleh gangguan obstruktif dimana proses spermatogenesis berlangsung normal dan gangguan non-obstruktif disebabkan dimana proses spermatogenesis terganggu. Faktor lain yang dapat berpengaruh terhadap berkurangnya konsentrasi sel sperma dalam cairan ejakulat adalah keadaan medis umum, diet, serta kekerapan ejakulasi.<sup>9</sup>

## 2.3 Kromosom Y

Kromosom Y tidak bersifat esensial untuk hidup, dan sampai akhir-akhir ini diduga tidak memiliki banyak peran. Determinasi seks (yang dikendalikan oleh gen SRY) telah lama diduga sebagai satu-satunya fungsi kromosom Y,<sup>14</sup> namun teori tersebut berubah dalam beberapa tahun terakhir ketika fungsi penting lainnya yaitu spermatogenesis ditemukan dan banyak gen-gen baru yang dipetakan dalam kromosom Y.<sup>3</sup>

Kromosom Y merupakan kromosom manusia paling kecil yang berukuran sekitar 60 Mb dengan lengan panjang (Yq) dan lengan pendek (Yp). Pengamatan sitogenetik berdasarkan pemetaan kromosom membagi kromosom Y terdiri dari regio pseudoautosomal (PAR), terdiri atas PAR1 dan PAR2, dan regio sisanya disebut sebagai NRY, terdiri atas daerah terang (eukromatik) dan gelap (heterokromatik).<sup>7</sup>

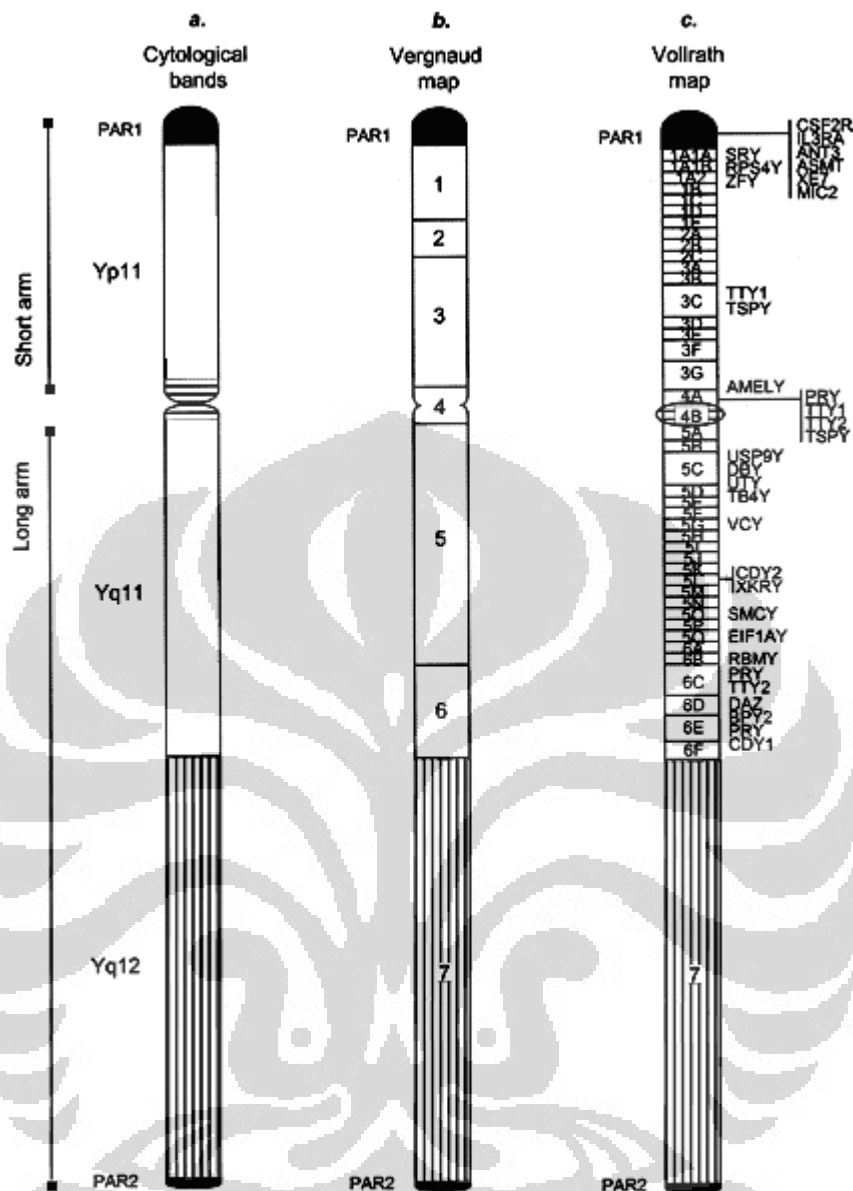




Gambar 2.2 Penggambaran skematik kromosom Y.

PAR merupakan bagian kromosom Y yang berpasangan dengan kromosom X selama proses meiosis. PAR1 terletak pada regio terminal lengan pendek kromosom Y (Yp) dan PAR2 terletak pada regio terminal lengan panjang kromosom Y (Yq). Lengan pendek kromosom Y (Yp11) dan lengan panjang kromosom Y bagian proksimal (Yq11) merupakan regio eukromatik, sementara lengan panjang kromosom Y distal (Yq12) merupakan bagian yang heterokromatik.<sup>7</sup>

Lebih dari 30 gen berhasil diidentifikasi pada kromosom Y. Gen-gen tersebut diklasifikasikan menjadi tiga kelompok berdasarkan lokasinya pada kromosom Y dan pola ekspresinya. Kelompok pertama adalah gen pseudoautosomal homolog X yang terletak pada PAR dan diekspresikan pada seluruh tubuh. Contoh gen pseudoautosomal adalah *CSF2RA*, *IL3RA*, *ANT3*, *ASMT*, *XEZ*, dan *MIC2*. Kelompok kedua adalah gen NRY homolog X yang terletak pada regio NRY dan diekspresikan secara luas pada seluruh tubuh. Contoh NRY homolog X adalah *USP9Y*, *DBY*, dan *UTY*. Kelompok ketiga adalah gen pada NRY spesifik Y yang terletak pada regio NRY dan diekspresikan spesifik pada testis. Contoh gen NRY spesifik Y adalah *SRY*, *DAZ*, *TSPY*, *CDY*, dan *RBM1*.<sup>7</sup>



Gambar 2.3 a. pemetaan kromosom Y dengan *cytological band*  
 b. pemetaan 7 interval kromosom Y menurut Vergnaud  
 c. pemetaan 43 interval kromosom Y menurut Vollrath

Pemetaan molekular kromosom Y pertama kali dilakukan oleh *Vergnaud et al*, membagi kromosom Y menjadi tujuh interval di luar PAR. Yp termasuk dalam interval 1-3, sentromer termasuk dalam interval 4, Yq11 termasuk dalam interval 5-6, dan Yq12 menjadi interval ke 7. Selanjutnya *Vollrath et al*, membagi daerah daerah aktif kromosom Y (Yp11 dan Yq11) kedalam 43 subinterval yang

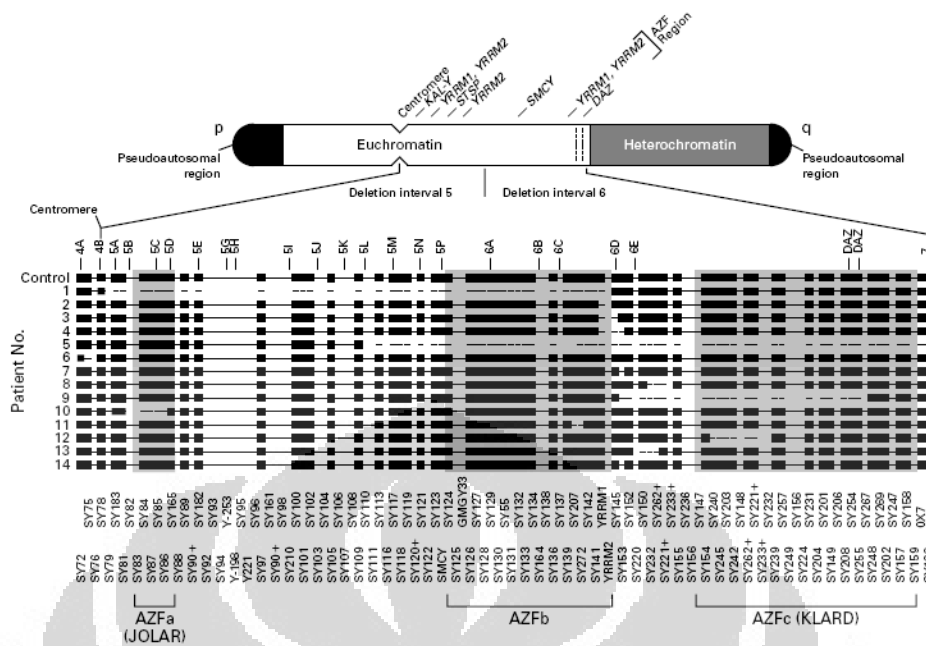
lebih spesifik.<sup>7</sup> Pemetaan *Vollrath et al* inilah yang paling banyak digunakan sampai sekarang.

#### 2.4 Azoospermia Factor (AZF)

Hubungan delesi kromosom Y dengan infertilitas pada pria pertama kali dicetuskan oleh *Tiepollo* dan *Zuffardi* pada tahun 1976. Dalam suatu penelitian, mereka menemukan pria steril yang mengalami delesi total Yq12 dan delesi sebagian Yq11. Karena Yq12 diketahui merupakan bagian kromosom Y yang tidak aktif, *Tiepollo* dan *Zuffardi* berkesimpulan ada faktor genetik pada Yq11 yang penting untuk perkembangan sel germinal pada pria. Gen atau kluster gen ini dinamakan *azoospermia factor* (AZF).<sup>7</sup>

Akan tetapi, dalam penelitian yang sama banyak ditemukan pasien dengan kromosom Y yang terlihat normal pada pemeriksaan sitologi, mengalami fenotip pasien dengan delesi Yq11. *Tiepollo* dan *Zuffardi* berasumsi terdapat mikrodelesi pada gen AZF. Mikrodelesi tidak dapat dideteksi pada pemeriksaan sitogenik namun dapat dideteksi pada pemeriksaan molekuler menggunakan *Sequences Tagged Sites - Polymerase Chain Reaction* (STS-PCR).<sup>7</sup>

Analisis molekuler lebih lanjut oleh *Vollrath et al* menunjukkan daerah eukromatik kromosom Y tersusun atas 43 subinterval, 25 diantaranya terletak pada Yq11. Dalam 25 subinterval Yq11 (D1 - D25) terdapat tiga regio yang sering mengalami mutasi pada pria infertil. Lokus-lokus tersebut dinamakan AZFa yang terletak antara regio D3-D6, AZFb yang terletak antara regio D13-16, dan AZFc yang terletak antara regio D20-D25.<sup>7</sup>



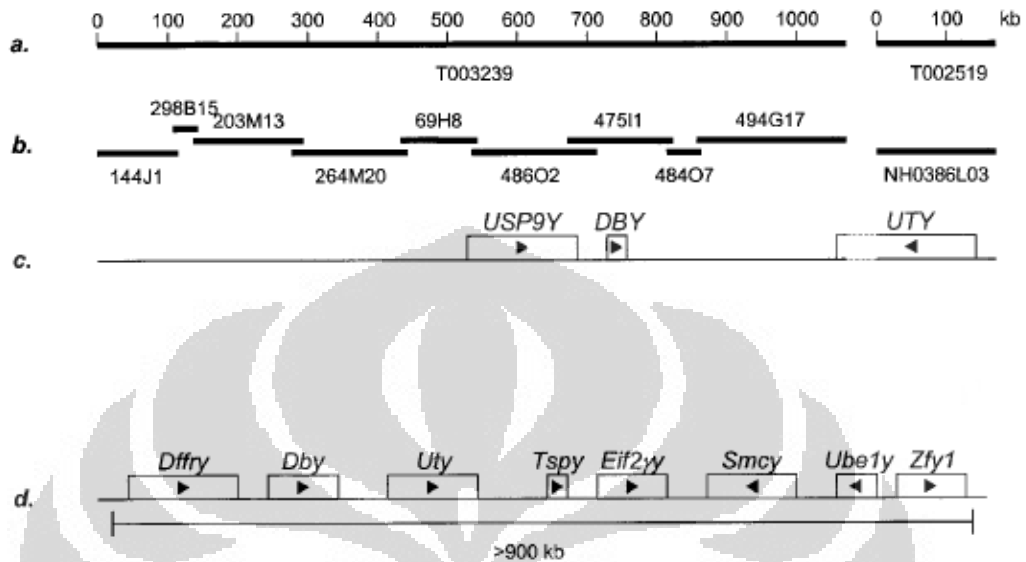
Gambar 2.5 Pemetaan regio-regio gen secara lebih terperinci.

#### 2.4.1 Azoospermic Factor A (AZF A) dan Gen Kandidatnya

AZFa terletak pada Yq11 proksimal, tepatnya subinterval D3-D6 menurut pemetaan Vollrath. Data-data terakhir menunjukkan bahwa lebih dari satu gen yang berperan untuk fenotipe AZFa. Walaupun penentuan interval yang benar-benar paling menentukan masih terus berlanjut, hingga kini telah didapatkan 3 gen yang pada interval ini. Ketiga gen tersebut memiliki homologi dengan interval gen tikus  $\Delta Sxr^b$ , yang terletak pada lengan Y kromosom pendek, yang delesinya menyebabkan gangguan spermatogenesis parah.<sup>7</sup>

Gen yang pertama adalah DFFRY (*Drosophila Fat Facets Related Y*), yang terakhir diubah namanya menjadi USP9Y (*Ubiquitin Specific Protease 9 Y*). Gen ini berbeda dari kandidat gen lainnya, DAZ dan RBMY. Gen ini tidak mengkode RNA *binding protein*, tetapi berfungsi sebagai hidrolase ubiquitin terminal C. Gen ini adalah gen satu-satunya; dan alih-alih terekspresi hanya di testis, gen ini terekspresi secara luas di banyak jaringan. Gen ini adalah homolog X yang tidak dipengaruhi oleh inaktivasi X. Yang menarik lagi adalah, USP9Y mengokupasi kurang dari separuh interval AZFa, sementara kebanyakan pria infertil menunjukkan tidak adanya gen ini. Hal tersebut menunjukkan bahwa

selain gen *USP9Y* sangat mungkin terdapat gen lainnya yang berperan dalam gangguan spermatogenesis.<sup>7</sup>



Gambar 2.6 Regio AZFa dan interval  $Sxr^b$ :

- Regio AZFa terdiri atas dua *contig* yang tidak saling bertumpang tindih.
- 10 klon yang bertumpang tindih sepanjang regio AZFa
- Letak 3 gen bila diperbandingkan dengan letak klon yang ada.
- Peta transkripsi  $Sxr^b$  pada tikus, yang menunjukkan homologi dengan interval AZFa.

Dari studi pemetaan komparatif, selain *USP9Y*, didapatkan 2 gen homolog X-Y lain lagi, yang juga terletak di interval  $Sxr^b$ , yang mungkin berperan dalam spermatogenesis, yaitu *DBY*, dan *UTY*. Ketiga gen tersebut *USP9Y*, *DBY*, dan *UTY* tampaknya muncul secara *ubiquitous*, berbeda dengan homolognya yang terdapat pada tikus.<sup>7</sup>

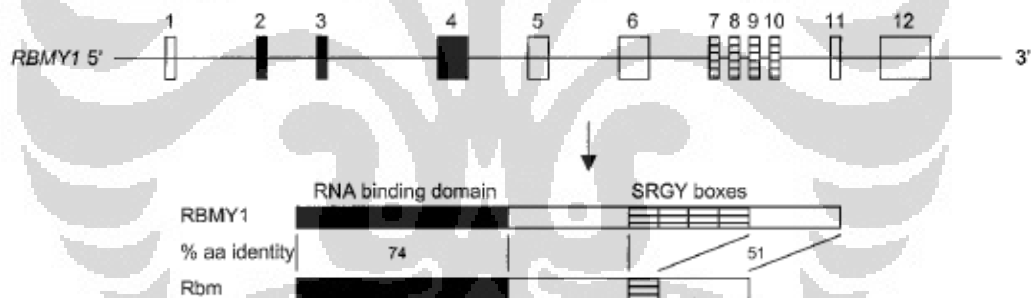
Jenis lainnya dan kerja masing-masing gen secara pastinya masih dipelajari, tapi secara umum berperan dalam pembentukan sel-sel germinal pada saat pubertas atau saat pembelahan meiosis. Mikrodelesi pada AZFa menyebabkan sindrom sel Sertoli tipe I (tidak ditemukannya sel spermatogenik pada semua tubulus) dan sindrom sel Sertoli tipe II (ditemukannya sel spermatogenik, terbatas pada sebagian tubulus).<sup>7</sup>

*DBY* memiliki 17 ekson dan mengkode *ATP-dependent RNA helicase*, tetapi fungsi jelasnya belum diketahui. Belakangan diketahui bahwa *DBY*

memiliki peran yang lebih signifikan pada spermatogenesis dan juga lebih sering mengalami delesi daripada USP9Y karena DBY menunjukkan *testis-specific transcript*, bukan *ubiquitous transcript* seperti USP9Y. Selain itu didapatkan DBY homolog secara signifikan dengan protein mencit PL10, protein spesifik untuk testis yang hanya diekspresikan pada sel germinal.<sup>7</sup>

#### 2.4.2 Azoozpermic Factor B (AZF B) dan Gen Kandidatnya

AZFb terletak pada Yq11 medial, tepatnya subinterval D13-D16 menurut pemetaan Vollrath. Sekuens yang rinci dan pemetaan yang akurat dari AZFb masih belum didapatkan, dan hanya klon dari YAC dan BAC yang tidak saling bertumpang tindih yang sudah didapatkan. Walaupun AZFb membentang dari subinterval 5O – 6B, batas-batasnya secara tegas belum dapat ditentukan. Untuk memetakan secara lebih rinci, kita membutuhkan kejadian-kejadian delesi yang berbeda antarindividu untuk dibandingkan.<sup>7</sup>



Gambar 2.7 Struktur genomik gen RBMY1.

Hingga saat ini, 2 gen telah dipetakan pada interval AZFb ini, yaitu EIF1AY, dan RBMY. EIF1AY mengkode isoform Y semua eIF-1A, yang merupakan *translation initiation factor* penting, yang memiliki homolog X dan diekspresikan secara ubiquitous. Peran gen ini dalam spermatogenesis masih belum diketahui, dan belum terdapat kasus yang khusus hanya melaporkan delesi gen ini saja. Oleh karena itu, gen ini tidak dianggap sebagai gen kandidat AZFb.<sup>7</sup>

RBMY merupakan gen kandidat AZF yang pertama kali diidentifikasi pada pasien dengan delesi pada regio proksimal interval 6. Pada awalnya, 2 cDNA yang mirip diisolasi dan diberi nama YRRM1 dan 2 (*Y-specific RNA recognition*

*motif*) karena keduanya diduga mengkode protein dengan *RNA binding motif*. Baru sesudahnya, diketahui bahwa, terdapat 20-50 gen dan pseudogen yang tersebar di kedua lengan kromosom Y, termasuk kluster yang terletak dalam regio AZFb dan YRRM diubah namanya menjadi keluarga gen RBMY. Salinan-salinan gen tersebut menjadi bagian dari sekurangnya 6 keluarga gen, namun RBMY-I adalah gen satu-satunya yang fungsional sehingga RBMY menjadi gen kandidat mayor untuk regio AZFb.<sup>7</sup>

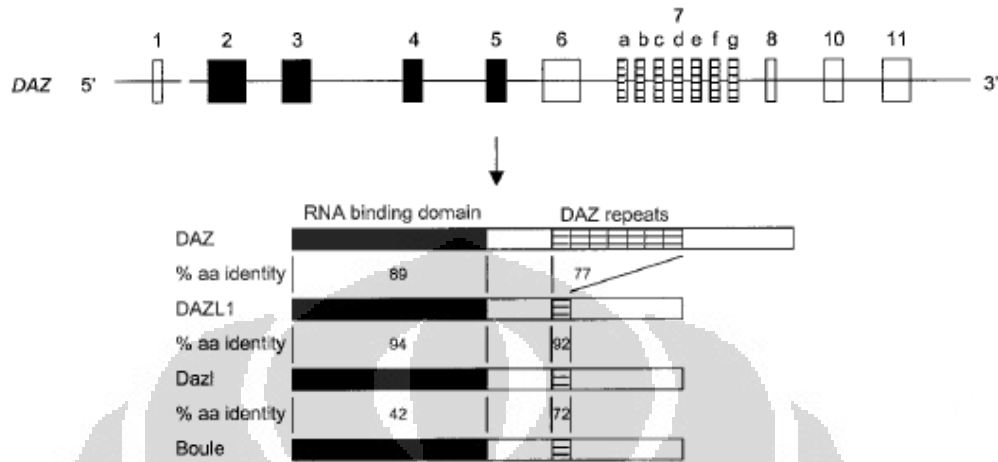
RBMY muncul sebagai gen multikopi pada semua mamalia *eutherian* (mamalia berplasenta) dan memiliki homolog X yang aktif yang belakangan ini ditemukan baik pada manusia dan marsupial. Diduga, RBMY memiliki fungsi yang luas, sementara RBMY telah berevolusi menjadi fungsi spesifik pria dalam spermatogenesis. Gen ini terdiri atas 12 ekson, dan pengulangan-pengulangan 37 residu dikode oleh satu ekson tunggal (ekson 7-10), yang menunjukkan lebih dari 85% homologi antara sekuens-sekuens nukleotidanya.<sup>7</sup>

Sesuai dengan perannya dalam spermatogenesis, gen RBMY diekspresikan hanya di dalam sel-sel germinal di dalam testis (spermatogonia, spermatosit, dan spermatid bundar). Fungsi RBMY sebenarnya dalam perkembangan sel-sel germinal pria masih belum jelas. Gen ini merupakan protein inti dengan modulasi dinamik pada lokasi spasialnya di berbagai sel-sel spermatogenik, yang membuat gen ini sepertinya memiliki peran di berbagai fungsi berbeda berkaitan dengan *splicing* pre mRNA. RBMY dianggap sebagai gen kandidat AZFb mayor karena sifatnya yang spesifik pada testis, ketiadaannya pada pasien yang infertil, dan homologinya dengan Rbm pada tikus (yang ketiadaannya dapat menyebabkan infertilitas).<sup>7</sup>

### 2.4.3 Azoozpermic Factor C (AZF C) dan Gen Kandidatnya

AZFc terletak pada Yq11 distal, tepatnya subinterval D20-D25 menurut pemetaan Vollrath. Pada awalnya, *Reijo et al.* mengklon sebuah gen dari bagian distal interval 6 yang mengalami delesi. Gen tersebut dinamai DAZ, dan pada awalnya diduga merupakan gen kopi tunggal. Sekarang telah jelas, bahwa DAZ merupakan satu keluarga multigen dengan lebih dari satu salinan pada kromosom Y. Oleh

karena itu, istilah gen DAZ diubah menjadi keluarga gen DAZ. Jumlah pasti gen anggotanya masih belum diketahui.



Gambar 2.8 Struktur genomik gen DAZ dan proteinnya.

DAZ, gen yang paling sering mengalami mikordelesi pada AZFc, memiliki struktur yang mirip dengan RBMY, berperan mengkode protein yang membantu perkembangan spermatogonia dan spermatosit sebelum mengalami pembelahan meiosis. AZF dan CDY1 merupakan kandidat gen yang paling bertanggung jawab terhadap fenotip pria dengan mikordelesi AZFc.<sup>7</sup>

Gen lain yang diduga turut berperan dalam fenotip mikordelesi AZFc adalah BP2Y, PRY, dan TTY2. Namun cara kerja secara pasti masing-masing kandidat gen tersebut masih dipelajari. Mikordelesi regio AZFc menyebabkan fenotip yang bervariasi dari sindroma sel sertoli baik tipe I maupun tipe II, *spermatogenesis arrest*, maupun kecacatan bentuk sperma.<sup>7</sup>

#### 2.4.4 Perbandingan gen-gen kandidat mayor AZF

Secara keseluruhan, dari kromosom Y kita mendapatkan beberapa gen kandidat yang walaupun kemungkinan besar dari penelitian sebelumnya terlihat berperan dalam proses spermatogenesis, ke depannya masih memerlukan penelitian lebih lanjut agar kita dapat memahami perannya dalam spermatogenesis secara lebih



rinci. Pada tabel 2.1 kita dapat melihat perbandingan gen-gen kandidat dari ketiga interval AZFa, AZFb, dan AZFc.

Tabel 2.1 Perbandingan karakteristik gen-gen kandidat AZF: DAZ, RBMY, USP9Y, dan DBY

	DAZ	RBMY	USP9Y	DBY
Letak	Yq (AZFc)	Yp dan Yq	Yq (AZFa)	Yq (AZFa)
Pengorganisasian Gen	Keluarga gen (kluster)	Keluarga gen	Gen tunggal	Gen tunggal
Struktur Gen	16 ekson	12 ekson	46 ekson	17 ekson
Ekspresi	Spesifik testis	Spesifik testis (spermatogonia, spermatisit, spermatid bundar)	<i>ubiquitous</i>	<i>Ubiquitous</i> dan <i>specific-testis transcripts</i> .
Protein	<i>RNA binding</i>	<i>RNA binding</i>	<i>Ubiquitin hydrolase H-Y antigen</i>	<i>RNA helicase</i>

## 2.5 Pemrosesan DNA

### 2.5.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR merupakan suatu teknik *in vitro* untuk mensintesis asam nukleat dengan cara mereplikasi atau mengamplifikasi suatu segmen DNA yang spesifik. Metode ini memerlukan, sepasang primer yang berpasangan, enzim polimerase, *deoxynucleoside triphosphates* (dNTP), larutan *buffer*, dan kation bivalen (magnesium). Semua bahan dicampurkan dan ditempatkan dalam tabung khusus, lalu mesin PCR diprogram dengan menyesuaikan temperatur tahapan denaturasi (*denaturation*), pemasangan primer (*annealing*), dan pemanjangan (*elongation*) sesuai dengan primer yang digunakan.<sup>15</sup>

Fase pertama adalah denaturasi awal dengan temperatur antara 94 - 98° C selama 4 menit diikuti fase denaturasi dengan temperatur antara 94 - 98° C selama

20 - 30 detik. Selama fase denaturasi rantai ganda DNA akan terpisah karena panas merusak ikatan hidrogen, membentuk dua rantai tunggal DNA.<sup>15</sup>

Fase berikutnya adalah pemasangan primer dengan temperatur antara 50 - 65 °C selama 20 - 40 detik. Pada fase ini, primer akan berpasangan dengan rantai tunggal DNA yang sesuai dan membentuk ikatan hidrogen. Pemasangan primer memerlukan suhu yang berbeda dari setiap primer. Semakin banyak gugus guanin atau sitosin yang membentuk tiga ikatan hidrogen dengan segmen DNA dalam satu primer, semakin tinggi suhu yang diperlukan.<sup>15</sup>

Fase pemanjangan terjadi setelah primer berpasangan dengan rantai tunggal DNA, dNTP akan membentuk rantai baru DNA yang berkomplementar dengan bantuan enzim polimerase sehingga terbentuk dua fragmen DNA rantai ganda. Temperatur optimal untuk fase pemanjangan adalah 72 °C. Setelah fase pemanjangan, proses berulang menuju fase denaturasi, diikuti fase pemasangan primer, lalu kembali ke fase pemanjangan. Proses tersebut diulang sesuai DNA yang diperlukan. Setelah fase pemanjangan terakhir, dilakukan pemanjangan final dengan temperatur antara 70 - 74 °C selama 5 sampai 15 menit. Hasil PCR dapat langsung dinilai menggunakan elektroforesis atau disimpan pada suhu 4 °C.<sup>15</sup>

Primer merupakan rantai asam nukleat yang berperan sebagai titik permulaan untuk replikasi DNA. Primer mutlak diperlukan karena enzim DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida pada strand DNA yang telah terbentuk. Primer yang sering digunakan untuk keperluan biologi molekuler biasanya merupakan oligonukleotida yang disintesis secara kimiawi dengan ukuran 20 - 30 pasang basa.<sup>15</sup>

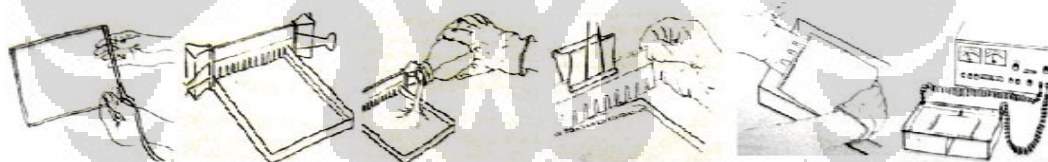
Nukleotida adalah molekul yang ketika bergabung akan membentuk struktur RNA atau DNA. Nukleotida tersusun atas basa nukleotida (adenin, guanin, timin, dan sitosin) yang terikat dengan ribosa atau deoksiribosa, dan memiliki satu sampai tiga gugus fosfat. Sementara dNTP merupakan nukleotida yang terikat deoksiribosa dan memiliki tiga gugus fosfat. Gugus fosfat yang berperan dalam reaksi enzimatik polimerisasi DNA akan terhidrolisis pada suasana asam. Untuk itu digunakan Buffer untuk menjaga pH campuran PCR antara 7,7 - 8,0.<sup>15</sup>

Sementara magnesium selain diperlukan dNTP dan DNA untuk melalui fase pemasangan primer dan pemanjangan dengan baik, juga diperlukan oleh tag polimerase untuk dapat bekerja dengan baik.<sup>15</sup>

### 2.5.2 Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis gel agarose merupakan suatu teknik untuk memisahkan fragmen deoxyribonucleic acid (DNA), fragmen ribonucleic acid (RNA), atau molekul protein menggunakan arus listrik yang dilewatkan pada matriks gel berdasarkan ukuran molekulnya.<sup>15</sup>

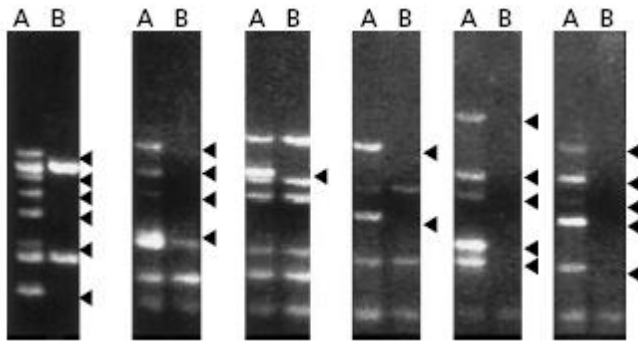
Agarose diekstraksi dari rumput laut, merupakan polimer linier yang tersusun atas monomer berupa D-galaktose-O-3,6-anhidro-L-galaktose. Gel agarose dihasilkan dengan memanaskan agarose dalam larutan buffer *tris-acetate EDTA* (TAE) sampai dihasilkan larutan bening. Larutan kemudian dituang ke dalam cetakan dan dibiarkan mengeras. Setelah mengeras, agarose membentuk matriks.<sup>15</sup>



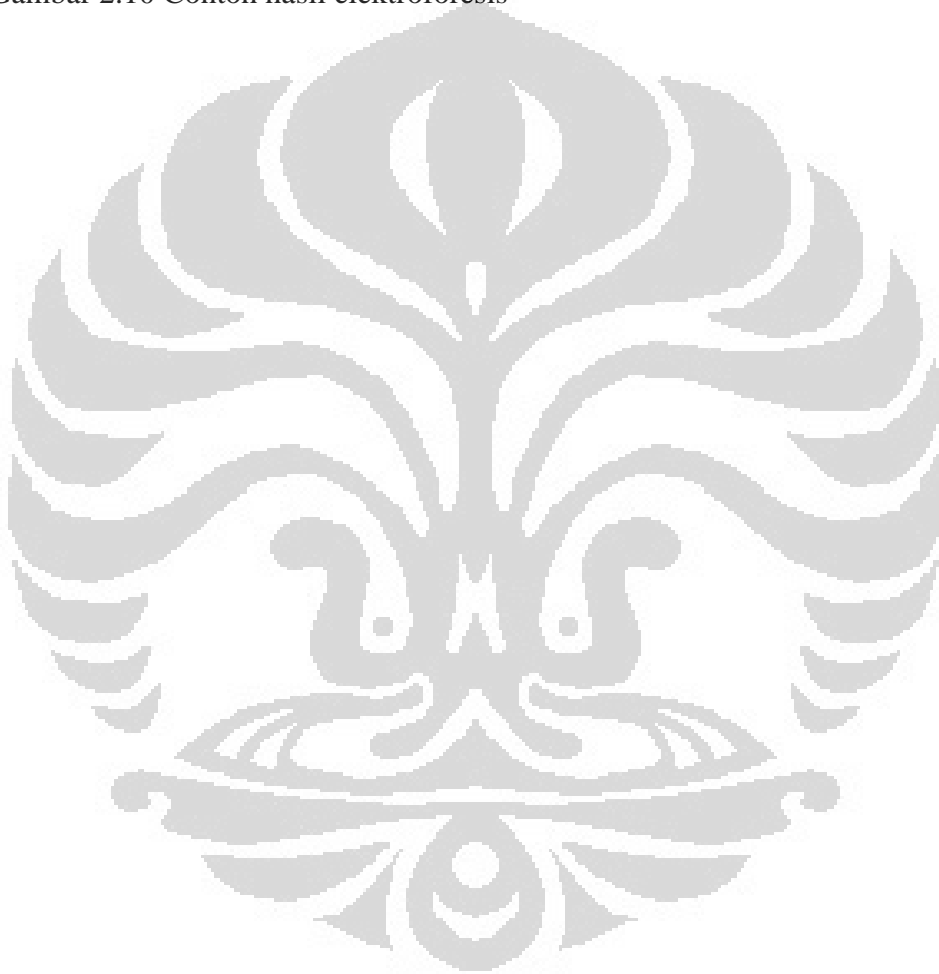
Gambar 2.9 Ilustrasi langkah-langkah pembuatan gel agarose.

Ketika medan listrik dialirkan sepanjang gel, DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bermigrasi ke arah anoda. Laju migrasi ditentukan oleh beberapa parameter seperti ukuran DNA, konsentrasi agarose, konformasi DNA, arah medan listrik, pewarna yang digunakan, dan komposisi buffer elektroforesis.<sup>15</sup>

Visualisasi pita DNA dilakukan dengan pemberian zat warna seperti etidium bromida yang memungkinkan visualisasi langsung dibawah sinar ultraviolet. Perlu diingat bahwa etidium bromida merupakan mutagen kuat.<sup>15</sup>



Gambar 2.10 Contoh hasil elektroforesis



## **BAB 3 METODOLOGI PENELITIAN**

### **3.1 Desain Penelitian**

Bentuk desain penelitian yang akan digunakan adalah bentuk deskriptif molekuler potong lintang untuk mengetahui dan membandingkan kekerapan mikrodelesi kromosom Y yang terjadi pada pria oligozoospermia dengan STS yang berbeda. Data yang diperoleh berasal dari eksperimen langsung peneliti sebanyak 9 sampel dan lainnya berasal dari data sekunder hasil penelitian serupa peneliti lain.

### **3.2 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan di Departemen Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia mulai bulan Mei 2007 hingga bulan November 2008.

### **3.3 Pemilihan Sampel**

#### **3.3.1 Kriteria Inklusi**

Kriteria inklusi pasien untuk penelitian ini adalah:

- Pria azoospermia atau oligozoospermia berat
- Bersedia ikut dalam penelitian

#### **3.3.2 Kriteria Eksklusi**

Kriteri eksklusi pasien yang tidak diikutsertakan dalam penelitian ini adalah pasien yang telah dipastikan oleh dokter andrologi memiliki infertilitas tipe obstruktif.

### **3.4 Besar Sampel**

Pria infertil dengan kriteria azoospermia dan oligozoospermia berat masing-masing 50 orang. pengambilan sampel terutama dilakukan pada pasien yang memeriksakan biopsi testisnya untuk mengetahui hubungan antara mikrodelesi kromosom Yq11 dengan kelainan spermatogenesisnya. Sampel diperoleh dari pasien dengan kriteria di atas yang datang ke Departemen Biologi Kedokteran FKUI atau berasal dari kiriman rumah sakit lainnya.

### 3.5 Cara Kerja

#### 3.5.1 Pengambilan Sampel

Sampel berupa 3 ml darah dari darah tepi pria oligospermia dan azoospermia, dimasukkan ke dalam tabung yang sebelumnya telah diberi heparin.

#### 3.5.2 Isolasi DNA

1. *Cell lysis solution* sebanyak 900µl dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* steril.
2. Pada tabung ditambahkan 300 ul darah pasien lalu dilakukan homogenasi dilanjutkan dengan inkubasi campuran 10 menit dalam suhu ruang.
3. Setelah diinkubasi, tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit.
4. Hasilnya yang berupa supernatan dibuang tanpa mengganggu pellet.
5. Pada pellet ditambahkan lagi 600 µl *cell lysis solution* ke pellet kemudian di-vortex sebentar.
6. Tahap 4 dan 5 diulangi sampai pellet terlihat putih.
7. Pada pellet ditambahkan 300 µl *nuclei lysis solution*. Larutan dipipet sebanyak 5-6 kali untuk melisis sel darah putih dan inti sel sehingga terlihat kental. Jika masih terlihat butiran-butiran kecil setelah pencampuran, maka larutan di-vorteks sampai butiran tersebut hilang.
8. Ke dalam campuran ditambahkan 100 µl *protein precipitation solution* ke kemudian di-vortex selama 20 detik sampai terlihat butiran protein halus.
9. Campuran kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit pada suhu ruang, hasilnya akan terlihat pellet dengan warna coklat terang dengan supernatan.
10. Bila supernatan masih berwarna coklat, supernatan dipindahkan ke tabung *microcentrifuge* bersih, kemudian langkah 9 dan 10 diulangi.
11. Setelah supernatan sudah terlihat jernih, supernatant dipindahkan ke dalam tabung *microcentrifuge* bersih yang sudah berisi 1 ml isopropanol. Tabung dibolak-balik perlahan sampai terlihat benang-benang putih halus (DNA).
12. Untuk optimalisasi, tabung disimpan tabung pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  *overnight*.

13. Tabung disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit sampai terlihat pellet putih, supernatan kemudian dibuang supernatan, kemudian dicuci dengan 400 µl alkohol 70% dingin.
14. Tabung kembali disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu ruang selama 3 menit.
15. Supernatan kemudian dibuang, DNA selanjutnya dikering anginkan pada suhu ruang.
16. DNA dilarutkan DNA dengan 100 µl *rehydration solution* kemudian DNA direhidrasi pada suhu 4°C *overnight* lalu DNA disimpan pada suhu -20°C.

### 3.5.3 DNA Sequencing

Proses DNA sequencing merupakan proses untuk memastikan urutan basa nukleotida pada STS uji yang akan digunakan benar-benar tepat. Langkah ini merupakan langkah yang penting karena, STS yang akan digunakan berperan sebagai alat ukur. Bila terjadi kesalahan pada alat ukur tersebut (STS), maka hasil penelitian ini menjadi tidak valid. Pada tabel 3.1 dapat dilihat berbagai STS uji yang akan digunakan dan urutan basa nukleotidanya.

Tabel 3.1 Urutan sekuens dari STS uji yang digunakan dalam penelitian ini.

Gen (subregion)	STS	Sekuens	Hasil (pb)
SRY (AZFa)	sY14_a	5'-gAA TAT TCC CgC TCT CCg gA-3'	472
	sY14_b	5-gCT ggT gCT CCA TTC TTg Ag-3'	
Anonim (AZFa)	sY84_a	5'-AgA Agg gTC TgA AAg CAg gT-3'	320
	sY84_b	5'-gCC TAC TAC CTg gAg gCT TC-3'	
Anonim (AZFa)	sY143_a	5'-gCA ggA TgA gAA gCA ggT Ag-3'	311
	sY143_b	5'-CCg TgT gCT ggA gAC TAA TC-3'	
RBM1 (AZFb)	RBM1_a	5'-ATg CAC TTC AgA gAT ACg g-3'	800
	RBM1_b	5'-CCT CTC TCC ACA AAA CCA ACA-3'	
DAZ (AZFc)	sY254_a	5'-ggg TgT TAC CAg AAg gCA AA-3'	380
	sY254_b	5'-gAA CCg TAT CTA CCA AAg CAg C-3'	
DAZ (AZFc)	sY255_a	5'-gTT ACA ggA TTC ggC gTg AT-3'	126

---

sY255\_b 5'-CTC gTC ATg TgC AgC CAC-3'

---

### 3.5.4 Amplifikasi Kandidat Gen

1. Untuk masing-masing 10 sampel PCR, dibuat larutan sesuai dengan komposisi di bawah ini (tabel 3.2) pada tabung *microcentrifuge* 1,5 ml.

Tabel 3.2 Bahan Campuran PCR

No	Zat	1 sampel	10 sampel
1	Buffer MgCl <sub>2</sub>	2,5 µl	25 µl
2	MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl	15 µl
3	dNTP	0,5 µl	5 µl
4	primer up stream	0,5 µl	5 µl
5	primer down stream	0,5 µl	5 µl
6	H <sub>2</sub> O	14,25 µl	142,5 µl
7	tag polimerase	0,25 µl	2,5 µl
	PCR mixture	20 µl	200 µl

2. Larutan PCR dipindahkan ke dalam 10 tabung *microcentrifuge* 0,2 ml dengan masing-masing tabung terdiri dari 20 µl.
3. Pada sembilan tabung *microcentrifuge* ditambahkan 5 µl DNA sampel, lalu diberi kode sesuai sampel. Satu tabung tidak ditambahkan DNA, melainkan H<sub>2</sub>O sebagai kontrol negatif.
4. Larutan PCR dicampur dengan baik (dengan menggunakan vortex).
5. Mesin PCR (*thermocycler*) diprogram dengan profil 35 siklus sesuai temperatur denaturasi, *annealing*, dan elongasi masing-masing primer (Tabel 3).
6. Tabung *microcentrifuge* diletakan pada mesin PCR, lalu mesin dijalankan.
7. Hasil amplifikasi kemudian dinilai dengan elektroforesis.



Tabel 3.3 Suhu denaturasi, annealing, dan ekstensi masing-masing STS.

STS	Suhu
sY14, sY143, sY254, sY255	94°C 30 detik, 63°C 30 detik, 72°C 1 menit
RBM1	94°C 30 detik, 58°C 30 detik, 72°C 1 menit
sY84	94°C 30 detik, 64°C 30 detik, 72°C 1 menit

### 3.5.5 Analisis Mikrodelesi Kromosom Y dengan Elektroforesis

1. Tray elektroforesis disiapkan dengan selotip dan dipasang sisir.
2. Agarosa bubuk ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dilarutkan dalam larutan TBE 50 ml untuk membuat gel agarosa 1% untuk DNA 300-1000bp.
3. Larutan agarosa tersebut dimasak sampai mendidih dan larut.
4. Larutan dibiarkan sampai agak dingin, kira-kira 70°C, kemudian dimasukkan 1 µl 0,1% ethidium bromida.
5. Larutan agarosa dituangkan ke dalam *tray* elektroforesis yang telah disiapkan, lalu agarosa dibiarkan dingin dan mengeras.
6. Sementara menunggu gel agarose mengeras, larutan DNA disiapkan dengan *loading buffer* dengan komposisi 1 µl *loading buffer* dan 20µl larutan DNA hasil PCR.
7. Setelah gel agarose mengeras, selotip dilepaskan, tray dipasang berikut isinya ke dalam *chamber* elektroforesis, sisir dicabut pada gel, kemudian larutan TBE dituang sampai melebihi permukaan gel.
8. Larutan *loading buffer* yang telah ditambahkan pada DNA dimasukkan ke dalam sumur yang terbentuk dari sisir yang telah diangkat secara hati-hati dan perlahan.
9. Alat elektroforesis dihubungkan dengan *power supply* yang telah diatur dengan voltase 95 volt selama 1 jam.
10. pita-pita (*bands*) yang terbentuk diamati dengan menggunakan UV *transiluminator* dan jika diperlukan dapat difoto dengan kamera.

### 3.6 Etika Penelitian

Penelitian ini mengikuti kaidah sesuai etika penelitian yang berlaku dengan merahasiakan semua data pasien yang ada sehingga sampel dari pasien tidak dapat dilacak keberadaannya. Dalam mengolah data sampel di laboratorium, penulis menggunakan kode-kode agar kerahasiaan identitas pasien tetap terjaga.

Dalam mendapatkan pasien sebagai sampel, penulis juga selalu meminta persetujuan pasien. Pasien terlebih dahulu diberi penjelasan tentang tindakan yang akan dilakukan kepadanya, yaitu pengambilan darah. Pasien juga diberi penjelasan, bahwa hasil pemeriksaannya akan digunakan untuk penelitian epidemiologi yang sedang dilakukan oleh penulis, namun kerahasiaan identitas pasien akan selalu terjaga. Apabila pasien bersedia, pasien diminta mengisi “Surat Pernyataan Persetujuan Tindakan Medik: Untuk Penelitian Analisis Mikrodelesi Kromosom Y” dan membubuhkan tanda tangannya.

## BAB 4 HASIL PENELITIAN

### 4.1 Hasil Analisis Semen dan Pemeriksaan dengan STS

#### 4.1.1 Hasil Analisis Semen dan STS pada Pria Normozoospermia

Pria normozoospermia yang semennya dianalisis dan diperiksa dengan STS berfungsi sebagai kontrol positif atas penelitian ini. Kita dapat melihat dari 10 pasien pria normozoospermia yang diperiksa dengan STS sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, maupun sY255; pada hasil elektroforesisnya semuanya menunjukkan adanya pita spesifik. Hal tersebut menunjukkan tidak adanya mikrodlesi semua regio gen tersebut pada semua sampel yang diperiksa.

Tabel 4.1 Data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada kelompok pria normozoospermia.

No.	Nomor sampel	Jumlah sperma (jt/ml)	STS					
			sY14	sY84	sY143	RBM1	sY254	sY255
1	25*	26,4	+	+	+	+	+	+
2	26b*	94,0	+	+	+	+	+	+
3	27*	32,8	+	+	+	+	+	+
4	34*	73,4	+	+	+	+	+	+
5	35*	90,9	+	+	+	+	+	+
6	39*	46,3	+	+	+	+	+	+
7	46*	39,8	+	+	+	+	+	+
8	48*	39,2	+	+	+	+	+	+
9	22Y	35,6	+	+	+	+	+	+
10	67Y	63,0	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

+ = ada pita spesifik pada hasil elektroforesis

\* = genom DNA dipakai bersama dengan kelompok lain

Y = genom DNA khusus untuk kelompok penelitian mikrodlesi kromosom Y

#### 4.1.2 Hasil Analisis Semen dan Hasil Pemeriksaan STS pada Pria Oligozoospermia

Pria oligozoospermia yang semennya dilakukan analisis dan diperiksa dengan STS, merupakan sampel dalam penelitian ini. Kelimapoluh semen pasien yang diperiksa semuanya memenuhi kriteria inklusi sehingga layak menjadi subyek penelitian ini, yakni pria yang oligozoospermia. Pada pemeriksaan dengan STS sY14, semua hasil elektroforesis semen pasien menunjukkan pita yang spesifik, sehingga dapat disimpulkan tidak terjadi mikrodelesi pada regio sY14 tersebut. Demikian pula, kesemua hasil elektroforesis dengan menggunakan baik STS sY84, sY143, maupun RBM1 menunjukkan adanya pita yang spesifik, sehingga dapat disimpulkan pada regio sY84, sY143, dan RBM1 tersebut tidak terjadi mikrodelesi.

Namun, pada pemeriksaan dengan menggunakan STS sY254, sebanyak satu dari jumlah 50 sampel yang diperiksa, hasil elektroforesisnya tidak menunjukkan adanya pita yang spesifik. Hal tersebut menunjukkan adanya mikrodelesi sebesar 2% dari seluruh subyek penelitian. Pada pemeriksaan dengan menggunakan STS sY254, sebanyak satu dari jumlah 50 sampel yang diperiksa, hasil elektroforesisnya tidak menunjukkan adanya pita yang spesifik. Hal tersebut menunjukkan adanya mikrodelesi sebesar 2% dari seluruh subyek penelitian

Tabel 4.2 Data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada kelompok pria oligozoospermia berat (<5 juta spermatozoa/ml).

No.	Nomor sampel	Jumlah sperma (jt/ml)	STS					
			sY14	sY84	sY143	RBM1	sY254	sY255
1	18*	2,1	+	+	+	+	+	+
2	33*	1	+	+	+	+	+	+
3	47*	4,6	+	+	+	+	+	+
4	50*	1	+	+	+	+	+	+
5	53b*	0,7	+	+	+	+	-	-
6	59*	4,1	+	+	+	+	+	+
7	62*	0,9	+	+	+	+	+	+

8	66*	1,8	+	+	+	+	+	+
9	67*	0,2	+	+	+	+	+	+
10	76b*	0,2	+	+	+	+	+	+
11	83b*	2,2	+	+	+	+	+	+
12	89b*	0,3	+	+	+	+	+	+
13	90b*	4,3	+	+	+	+	+	+
14	91b*	0,9	+	+	+	+	+	+
15	94b*	3,6	+	+	+	+	+	+
16	9Y	0,1	+	+	+	+	+	+
17	10Y	2,1	+	+	+	+	+	+
18	14Y	4,2	+	+	+	+	+	+
19	15Y	2,4	+	+	+	+	+	+
20	17Y	5 sp.	+	+	+	+	+	+
21	20Y	0,2	+	+	+	+	+	+
22	31Y	0,9	+	+	+	+	+	+
23	32Y	4,5	+	+	+	+	+	+
24	33Y	0,4	+	+	+	+	+	+
25	35Y	0,6	+	+	+	+	+	+
26	36Y	0,1	+	+	+	+	+	+
27	39Y	4,9	+	+	+	+	+	+
28	41Y	0,3	+	+	+	+	+	+
29	43Y	1,2	+	+	+	+	+	+
30	44Y	0,5	+	+	+	+	+	+
31	45Y	0,8	+	+	+	+	+	+
32	47Y	0,3	+	+	+	+	+	+
33	51Y	0,7	+	+	+	+	+	+
34	53Y	4,9	+	+	+	+	+	+
35	54Y	4,8	+	+	+	+	+	+
36	55Y	1,4	+	+	+	+	+	+
37	65Y	2,6	+	+	+	+	+	+
38	73Y	1,7	+	+	+	+	+	+

39	74Y	2,4	+	+	+	+	+	+
40	77Y	2,5	+	+	+	+	+	+
41	80Y	0,4	+	+	+	+	+	+
42	82Y	0,6	+	+	+	+	+	+
43	88Y	0,5	+	+	+	+	+	+
44	90Y	4,0	+	+	+	+	+	+
45	93Y	0,3	+	+	+	+	+	+
46	96Y	3,8	+	+	+	+	+	+
47	104Y	2,5	+	+	+	+	+	+
48	106Y	4,5	+	+	+	+	+	+
49	107Y	0,8	+	+	+	+	+	+
50	108Y	1,0	+	+	+	+	+	+

Keterangan:

- + = ada pita spesifik pada hasil elektroforesis
- = tidak ada pita spesifik pada hasil elektroforesis
- \* = genom DNA dipakai bersamaan dengan kelompok lain
- Y = genom DNA khusus untuk kelompok penelitian mikrodlesi kromosom Y

#### 4.1.3 Data Hasil Pemeriksaan STS pada Kontrol Negatif

Sebagai kontrol negatif pada penelitian ini digunakan kelompok wanita yang memiliki anak sebanyak 8 orang. Hasil elektroforesis kedelapan pasien tersebut tidak ada satupun yang menunjukkan adanya pita spesifik pada hasil elektroforesisnya.

Tabel 4.3 Data hasil pemeriksaan STS pada kelompok wanita yang memiliki anak.

No.	Nomor sampel	STS					
		sY14	sY84	sY143	RBM1	sY254	sY255
1	F1	-	-	-	-	-	-
2	F6	-	-	-	-	-	-
3	F7	-	-	-	-	-	-
4	F10	-	-	-	-	-	-

5	F13	-	-	-	-	-	-
6	F15	-	-	-	-	-	-
7	W1	-	-	-	-	-	-
8	W2	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

- = tidak ada pita spesifik pada hasil elektroforesis
- F = genom DNA dipakai bersamaan dengan kelompok lain
- W = genom DNA khusus untuk kelompok penelitian mikrodeles kromosom Y

## 4.2 Analisis Data

Dari data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada pria normozoospermia di atas, kita dapat menyimpulkan bahwa pada regio sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, dan sY255 kesepuluh pria yang berperan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini tidak ditemukan adanya mikrodelesi.

Sementara itu, dari data analisis semen dan hasil pemeriksaan STS pada pria oligozoospermia di atas, kita dapat melihat bahwa pada regio sY14, sY84, sY143, dan RBM1 tidak ditemukan adanya mikrodelesi. Sementara itu, adanya salah satu pasien yang hasil elektroforesis dari pemeriksaan STS sY254-nya tidak menunjukkan pita spesifik, menunjukkan adanya mikrodelesi pada regio sY254 pada 1 pasien tersebut. Demikian pula, adanya salah satu pasien yang hasil elektroforesis dari pemeriksaan STS sY255-nya tidak menunjukkan pita spesifik, menunjukkan adanya mikrodelesi pada regio sY254 pada 1 pasien tersebut.

Bila kita membandingkan dengan jumlah keseluruhan sampel yang diperiksa, maka kita dapat melihat sebanyak 2% sampel mengalami mikrodelesi pada regio sY254, dan juga sebanyak 2% sampel mengalami mikrodelesi pada regio sY255. Mikrodelesi pada regio sY254 dan regio sY255 terjadi pada sampel yang sama, yang dapat menunjukkan hubungan antara kedua gen. Kemungkinan hubungan tersebut akan penulis uraikan dalam bab pembahasan.

## **BAB 5 PEMBAHASAN**

Berdasarkan hasil analisis data pada bab sebelumnya, maka dapat terlihat bahwa regio yang tersering mengalami mikrodelesi di antara regio-regio lainnya yang diujikan, yakni sY14, sY84, s143, RBM1, sY254, dan sY255; adalah regio sY254 dan sY255. Tingkat kekerapan mikrodelesi sY254 di antara seluruh sampel yang berjumlah 50 adalah 2% (1 sampel mengalami mikrodelesi). Sementara, tingkat kekerapan mikrodelesi sY255 di antara seluruh sampel yang berjumlah sama adalah 2% (1 sampel mengalami mikrodelesi).

Di sisi lain, hasil analisis data kontrol positif menunjukkan bahwa seluruh sampel tidak mengalami satupun mikrodelesi pada regio yang diuji, yaitu regio sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, dan sY255. Hasil analisis data kontrol negatif menunjukkan hasil yang sebaliknya, sesuai harapan, yaitu tidak ada satupun regio gen sY14, sY84, RBM1, sY254, maupun sY255 yang ditemukan.

Walaupun baik kontrol positif maupun kontrol negatif menunjukkan hasil yang sesuai harapan penulis, penulis merasa jumlah kontrol positif yang berjumlah 10 sampel masih kurang. Ketidakseimbangan jumlah sampel yang diuji dengan jumlah sampel kontrol positif pada penelitian ini menyebabkan kontrol positif menjadi kurang sensitif. Hal tersebut pada akhirnya akan menyebabkan kesalahan pembacaan mikrodelesi yang positif palsu (*false positive microdeletion*).

Pada penelitian ini, penulis mendapatkan tingkat kekerapan mikrodelesi pada pasien oligozoospermia sebesar 2%. Angka 2% tersebut tidak akan terdeteksi baik pada kontrol positif maupun negatif. Untuk menghasilkan tingkat kekerapan mikrodelesi sebesar 2% pada kontrol positif, kita membutuhkan ( $2\% \times 10 \text{ sampel} = 0,2 \text{ sampel}$ ) 0,2 sampel yang mengalami mikrodelesi. Hal tersebut tidak mungkin karena masing-masing sampel adalah satu kesatuan yang utuh, yang tidak mungkin menghasilkan pembacaan yang sebagian positif dan sebagian negatif. Apabila kita memperbesar jumlah sampel kontrol positif –menjadi setara sampel yang diujikan, misalnya – masih terbuka kemungkinan kita akan mendapatkan pula pembacaan mikrodelesi pada kontrol positif tersebut.



Kehati-hatian dalam menentukan perimbangan kontrol positif dan sampel yang diperiksa sangat penting. *Chang et al.*<sup>16</sup> dalam laporannya menyatakan bahwa beberapa mikrodelesi Y, walaupun jarang, dapat terjadi pada pria yang fertil. Bahkan *Pryor et al.* dalam penelitiannya menemukan 4 mikrodelesi kromosom Y dari 200 pria fertil yang ditelitinya, yakni pada regio sY207 dan regio sY272.

Di pihak lain, kurangnya sampel untuk kontrol negatif tidak terlalu berpengaruh besar terhadap penelitian, karena penelitian ini bertujuan mengetahui gen mana yang mengalami mikrodelesi pada kelainan oligozoospermia. Kontrol negatif dalam penelitian ini hanya berfungsi sebagai panduan untuk pembacaan hasil saja. Kontrol negatif yang menunjukkan pita pada hasil pembacaan juga mungkin terjadi. Hal tersebut dapat berarti gen (atau kita sebut kandidat gen) yang diujikan tidak tunggal dan memiliki salinan di lokasi-lokasi selain kromosom Y.

Kedua gen yang mengalami mikrodelesi dalam penelitian ini, sY254 dan sY255, berdasarkan pemetaan *Volrath et al.* termasuk ke dalam keluarga gen DAZ<sup>7</sup>. DAZ ini merupakan gen kandidat yang acapkali mengalami mikrodelesi, baik pada pasien azoospermia, maupun oligozoospermia pada berbagai penelitian di berbagai negara. DAZ itu sendiri merupakan satu dari 4 gen kandidat kuat untuk AZF. Tiga gen selain DAZ tersebut adalah RBMY, USP9Y, dan DBY.

Penelitian serupa yang dilakukan pada pria Iran (dengan jumlah sampel campuran azoospermia dan oligospermia) menunjukkan hasil yang bermakna serupa, bahwa sY254 termasuk salah satu regio gen yang tersering mengalami mikrodelesi. Sebanyak 5% pasien mengalami mikrodelesi pada regio sY254.<sup>17</sup> Regio lainnya yang juga diujikan, yaitu sY81, sY83, sY127, sY130, sY131, sY147, sY149, sY157, sY158, sY254 and sY276 tidak menunjukkan adanya mikrodelesi.

Penelitian lainnya di Italia (juga dengan sampel gabungan azoospermia dan oligozoospermia) menunjukkan hasil yang juga tidak jauh berbeda. Dari total 67 sampel, sebanyak 4 sampel mengalami mikrodelesi pada interval 6, termasuk gen DAZ. Sementara 1 sampel mengalami mikrodelesi pada lokus di daerah proksimal Yq11.<sup>18</sup>

Mikrodelesi DAZ ini ditemukan dengan kekerapan yang tinggi hampir di semua penelitian. Bila kita menelusuri lebih jauh, sangat menarik melihat bahwa gen atau keluarga gen DAZ ini ditemukan di begitu banyak makhluk hidup lainnya, di antaranya mamalia dan *Drosophila*. Yang lebih menarik lagi, gen tersebut memiliki tingkat homologi yang tinggi dengan gen pengatur spermatogenesis pada *Drosophila* yang mengalami mutasi, *boule*.<sup>7</sup> Adanya gen tersebut menyebabkan proses spermatogenesis tidak terjadi. Tidak hanya DAZ saja, RBMY juga memiliki homologi dengan gen *Rbm* pada tikus, sementara ketiga gen pada regio AZFa (*USP9Y*, *DBY*, dan *UTY*) juga memiliki homologinya pada tikus, yaitu *Dffry*, dan *Dby*.

Keberadaan gen-gen yang mempunyai homologi pada makhluk hidup lain, apalagi dengan fungsi spermatogenesis pada makhluk hidup. Bila kita kembali mengacu kepada biologi molekuler dasar di mana gen memiliki peran yang sentral dalam menentukan suatu fenotipe, adanya tingkat homologi yang tinggi –yang berarti memiliki banyak kesamaan nukleotida– dapat pula menggambarkan kesamaan fungsi yang diwakili oleh kedua gen tersebut. Kedua gen tersebut mungkin mengatur translasi protein yang sama, dan pada akhirnya dapat diduga mengatur fungsi yang sama.

Dalam kasus ini, dengan tingkat homologi yang tinggi, kemungkinan keduanya memang adalah gen yang berperan dalam spermatogenesis. Walaupun demikian, kita masih butuh banyak penelitian lagi untuk menentukan dengan pasti peranan gen DAZ dalam fisiologi reproduksi manusia. Salah satu penelitian yang mungkin akan sangat menarik adalah penelitian eksperimental, di mana kita dengan sengaja memberi perlakuan berbeda pada sebagian dari keseluruhan sampel, sehingga sebagian sampel tersebut mengalami mikrodelesi gen yang telah kita tentukan sebelumnya. Dengan melakukan penelitian eksperimental dengan desain tersebut, kita dapat melihat dengan nyata fenotipe apa yang berubah dari sampel.

Akhirnya, pengetahuan kita tentang gen-gen masih sangat terbatas. Masih banyak gen-gen maupun kandidat gen yang belum terungkap. *Kent-First M et al.*<sup>19</sup> dalam artikelnya menuliskan tentang kemungkinan adanya regio keempat AZF yakni AZFd, yang terletak di antara AZFb dan AZFc. Pasien yang memiliki

delesi pada AZFd dapat hanya mengalami oligozoospermia atau bahkan hitung sperma yang normal dengan morfologi yang abnormal. Ke depannya, seperti yang sudah diutarakan oleh penulis, penelitian dengan desain eksperimental akan jauh lebih baik. Penelitian dengan tipe potong lintang terlalu bersifat ‘menunggu’, dan bergantung pada ada atau tidaknya kasus pria dengan mikrodelesi tertentu.



## **BAB 6**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Kesimpulan**

1. Kecepatan mikrodeselesi kromosom Y pada pria oligozoospermia di Jakarta tahun 2007 - 2008 dengan menggunakan STS uji sY254 dan sY255, masing-masing sebesar 2%.
2. Kandidat gen yang paling sering mengalami mikrodeselesi pada kromosom Y di antara kandidat gen lainnya (sY14, sY84, sY143, RBM1, sY254, dan sY255) adalah sY254 dan sY255.

#### **6.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan jumlah sampel dan STS yang lebih banyak. Sampel yang lebih banyak akan memperkuat hasil dari sampel yang diteliti, sementara STS yang lebih banyak berarti didapatkan gambaran tingkat kecepatan mikrodeselesi regio gen yang lebih akurat di antara semua regio gen lainnya.
2. Penelitian dengan metode eksperimental pada gen-gen yang memiliki tingkat homologi tinggi di hewan baik untuk dilakukan. Jika pada manusia penelitian yang dengan sengaja memberi perlakuan mikrodeselesi atas suatu gen tidak memungkinkan karena bertentangan dengan etik, pada tingkat hewan penelitian tersebut masih mungkin untuk dilakukan.
3. Pemeriksaan mikrodeselesi kromosom Y dapat digunakan sebagai salah satu alat diagnostik pada pria infertil, dan dapat membantu memangkas terbuangnya biaya yang tidak perlu akibat lamanya proses diagnostik serta penatalaksanaan yang kurang tepat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ramelan W. Kelainan genetik sebagai penyebab kemandulan pada pria.  
Dalam: Simposium Sehari Kesehatan Reproduksi Pria, Aula FKUI; 2000.
2. Rubenstein J, Brannigan RE. Male infertility. Emed J. 2008 Mar [dikutip 3 Juni 2009]. Diunduh dari: <http://emedicine.medscape.com/article/436829-overview>
3. Tiepolo L, Zuffardi O. 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Hum Genet 34:119-124.
4. Vogt PH, Edelman A, Kirsh S, Hnegariu O, Hirschman P, Kieserwetter F. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. Human Molecular Genetics 1996; 5 : 33-43.
5. Vogt PH. The locus of sY84 is not associated with spermatogenesis is better to find adam or study spermatogenesis? A different opinion. Fertil and Steril; 1999: 6 : 373-6.
6. Chandley AC, Cooke H. Human male fertility Y-linked genes and spermatogenesis. Human Molecular Genetics 1994; 3: 1449-52.
7. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. Endocrine Reviews 22 (2): 226-239. 2001 [dikutip 21 Mei 2009]. Diunduh dari: <http://edrv.endojournals.org/cgi/content/full/22/2/226>
8. Sherwood L. Human physiology: from cells to systems. 6<sup>th</sup> ed. Belmont, CA. Thomson Higher Education; 2007.
9. Brugh VM, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. Fertil and Steril 2004. 88 (2): 367-85.
10. Lania C, Grasso M, Fortuna F, Santis D, Fusi F. Open epididymal sperm aspiration (OESA): minimally invasive surgical technique for sperm retrieval. Arch.Esp.Urol.v.59n.3 Madrid abr.2006. Diunduh dari: [http://scielo.isciii.es/scieol.php?pid=S0004-06142006000300020&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scieol.php?pid=S0004-06142006000300020&script=sci_arttext)

11. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4<sup>th</sup> ed. New York. Cambridge University Press; 2000. h.60-62.
12. Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Human Reproduction*, Vol. 16, No. 4, 703-708, April 2001 [dikutip 1 Juni 2009]. Diunduh dari: <http://humrep.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/16/4/703>
13. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Bergen AHV, Nolten WE, Meisner L, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. 1997 [dikutip 9 Juni 2009]. Diunduh dari: <http://content.nejm.org/cgi/content/full/336/8/534>
14. Burgoyne PS. 1998. The mammalian Y chromosome: a new perspective. *Bioessays* 20:363-366.
15. Maniatis SF et al. In vitro amplification of DNA by polymeearase chain reaction dalam *Molecular cloning, a labolatory manual*. jilid 2. edisi ke 2. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. h. 6.3 – 6.9; 14.2-14.6.
16. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Ouststanding contribution: Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Human Reproduction* vol.14 no.11 p.2689-94, 1999
17. Asbagh FA, Sina A, Najmabadis H., Akbaris MT, Tabarroki A, Pourmand Gh. 2003. Prevalence of Y chromosome microdeletions in Iranian infertile men. Diunduh dari: [http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J\\_pdf/86520030306.pdf](http://www.sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/86520030306.pdf)
18. Grimaldi P, Scarponi C, Rossi P, March MR, Fabbri A, Isidori A, et al. Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Mol Hum Rep* 1998; 4(12): p.1116-21.
19. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, Meissner J, Chandley A, Gouchy G, Jorgensen L, Havighurst T, Grosch J. 1999. Defining region of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev* 53:27-41.

