

## BAB 4 HASIL

Setelah dilakukan pemeriksaan, didapatkan hasil dengan rincian sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil pemeriksaan STS uji kelompok pria normospermia

No	No Sampel	Jumlah Sperma	STS					
			sY14	sY239	sY242	sY254	sY255	sY1196
1	K1	22,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
2	K2	20,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
3	K3	20,6 juta/ml	+	+	+	+	+	+
4	K4	21,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
5	K5	22,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
6	K6	21,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
7	K7	20,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
8	K8	20,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
9	K9	21,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
10	K10	20,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+

Tabel 4.2. Hasil pemeriksaan STS uji kelompok wanita

No	No Sampel	Jumlah Sperma	STS					
			sY14	sY239	sY242	sY254	sY255	sY1196
1	K - 1	-	-	-	-	-	-	-
2	K - 2	-	-	-	-	-	-	-
3	K - 3	-	-	-	-	-	-	-
4	K - 4	-	-	-	-	-	-	-
5	K - 5	-	-	-	-	-	-	-
6	K - 6	-	-	-	-	-	-	-
7	K - 7	-	-	-	-	-	-	-
8	K - 8	-	-	-	-	-	-	-
9	K - 9	-	-	-	-	-	-	-
10	K - 10	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan STS uji kelompok pria oligozoospermia

No	No Sampel	Jumlah Sperma	STS					
			sY14	Sy239	sY242	sY254	sY255	sY1196
1	10	1,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
2	14	4,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
3	20	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
4	41	0,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
5	43	1,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
6	44	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
7	45	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
8	47	0,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
9	51	0,7 juta/ml	+	+	+	+	+	+
10	54	4,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
11	55	1,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
12	65	2,6 juta/ml	+	+	+	+	+	+
13	73	1,7 juta/ml	+	+	+	+	+	+
14	74	2,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
15	75	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
16	77	2,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
17	82	0,6 juta/ml	+	+	+	+	+	+
18	88	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
19	90	4,0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
20	92	1,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
21	93	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
22	96	3,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
23	101	1,0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
24	103	1,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan STS uji kelompok pria oligozoospermia

No	No Sampel	Jumlah Sperma	STS					
			sY14	sY239	sY242	sY254	sY255	sY1196
25	104	2,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
26	106	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
27	107	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
28	108	1,0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
29	116	2,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
30	136	1,1 juta/ml	+	+	+	+	+	+
31	138	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
32	142	0,1 juta/ml	+	+	+	+	+	+
33	144	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
34	146	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
35	147	0,7 juta/ml	+	+	+	+	+	+
36	152	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
37	205	0,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
38	207	1,1 juta/ml	+	+	+	+	+	+
39	208	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
40	209	2,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
41	211	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
42	213	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
43	214	2,0 juta/ml	+	+	+	+	+	-
44	216	0,9 juta/ml	+	+	+	+	+	+
45	218	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
46	219	0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
47	220	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
48	221	1,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan STS uji kelompok pria oligozoospermia

No	No Sampel	Jumlah Sperma	STS					
			sY14	sY239	sY242	sY254	sY255	sY1196
49	222	2,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
50	223	0,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
51	225	0,7 juta/ml	+	-	+	+	+	-
52	226	1,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
53	227	1,5 juta/ml	+	-	-	-	-	+
54	229	4,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
55	233	1,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
56	234	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
57	236	0,4 juta/ml	+	+	+	+	+	+
58	237	4,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
59	238	0,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
60	239	2,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
61	240	2,3 juta/ml	+	+	+	+	+	+
62	241	4,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
63	242	1,8 juta/ml	+	+	+	+	+	+
64	246	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
65	249	3,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
66	250	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
67	251	0,5 juta/ml	+	+	+	+	+	+
68	252	0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
69	263	0,2 juta/ml	+	+	+	+	+	+
70	267	0 juta/ml	+	+	+	+	+	+
			0	2	1	1	1	2
			0%	2,9%	1,4%	1,4%	1,4%	2,9%

Dari pada tabel dapat diringkas menjadi sebagai berikut:

1. Keberadaan mikordelesi disimpulkan setelah sedikitnya tiga kali kegagalan amplifikasi bersamaan dengan suksesnya amplifikasi SRY oleh STS sY14 yang berperan sebagai kontrol internal.
2. Dari 10 sampel pria normozoospermia sebagai kontrol positif ditemukan pita spesifik pada hasil elektroforesis pada keenam uji *Sequence Tagged Sites* (STS) (tabel 4). Temuan ini menandakan tidak terdeteksi adanya mikordelesi kromosom Y.
3. Dari 10 sampel wanita sebagai kontrol negatif tidak ditemukan pita spesifik pada hasil elektroforesis pada keenam uji STS (tabel 5). Temuan ini menandakan tidak terdeteksinya region spesifik STS karena pada wanita tidak terdapat kromosom Y
4. Dari 70 sampel pria penderita oligospermia di Jakarta, tiga orang (4,3%) mengalami mikordelesi kromosom Y, yaitu sampel nomor 214, 225, dan 227. (tabel 6)
5. Dari tiga sampel yang mengalami mikordelesi,
  - a. satu orang mengalami mikordelesi pada satu STS, yaitu sampel nomor 214, pada STS sY1196
  - b. satu orang mengalami mikordelesi pada dua STS yang berbeda, yaitu sampel nomor 225 pada STS sY239 dan sY 242
  - c. satu orang mengalami mikordelesi pada empat STS yang berbeda, yaitu sampel nomor 227 pada STS sY239, sY 242, sY254, sY255
6. Dari enam STS yang digunakan dalam penelitian ini,
  - a. dua orang (2,9%) mengalami mikordelesi yang terdeteksi pada STS sY239 dan sY1196, yaitu sampel nomor 225 dan 227.
  - b. satu orang (1,4%) mengalami mikordelesi yang terdeteksi pada STS sY242, sY254, dan sY255, yaitu sampel nomor 227.

## BAB 5 PEMBAHASAN

Kromosom Y bukan hanya berperan sebagai penentu jenis kelamin, tetapi juga berperan dalam perkembangan sel germinal. Peran kromosom Y dalam perkembangan sel germinal pertama kali dicetuskan oleh *Tiepollo* dan *Zuffardi*, menemukan adanya pria infertil mengalami delesi parsial Yq11.<sup>2,5,12</sup> Namun dalam penelitian yang sama, banyak ditemukan pasien tanpa delesi kromosom Y pada pemeriksaan sitologi, mengalami fenotip sama dengan pasien dengan delesi Yq11. *Tiepollo* dan *Zuffardi* mengemukakan hipotesis bahwa terdapat delesi yang tidak terdeteksi dengan pemeriksaan sitogenik.<sup>12</sup>

Penelitian molekuler lebih lanjut menemukan 76 lokus gen pada Yq11 yang dibagi ke dalam 25 interval (D1-25) berdasarkan pemetaan *Vollrath et al.* Delesi pada Yq11 sering terjadi ditemukan pada regio proksimal (D3-6) yang selanjutnya dinamakan AZFa, regio medial (D13-16) yang selanjutnya dinamakan AZFb, dan regio distal (D20-22) yang selanjutnya dinamakan AZFc.<sup>4,5</sup> Delesi pada AZF sering terjadi dalam ukuran submikroskopis yang tidak terdeteksi dengan pemeriksaan sitogenik sehingga disebut sebagai mikrodelesi.<sup>12</sup>

Prevalensi global mikrodelesi regio AZF berkisar antara 4-14% pada pria oligozoospermia dan antara 11-18% pada pria azoospermia.<sup>5</sup> Dari berbagai penelitian, tidak tampak korelasi berarti antara lokasi delesi dengan kelainan fenotip pada jaringan testikular, Namun tampak jelas semakin besar delesi akan semakin buruk kerusakan pada jaringan testikuler.<sup>5</sup>

Tabel 5.1. Analisis semen pada delesi regio AZFa, b, dan c

Fenotip	Regio AZF					
	a	b	c	a + b	b + c	a + b + c
azoospermia	8/12 (67 %)	21/31 (68 %)	54/100 (54)	2/4 (50)	24/25 (96 %)	15/15 (100 %)
oligozoospermia	4/12 (33 %)	10/31 (32 %)	46/100 (46 %)	2/4 (50 %)	1/25 (4 %)	

Selain itu, tampak jelas pula perbedaan frekuensi dan kandidat gen pada regio AZF yang mengalami mikrodelesi pada beberapa penelitian pada beberapa negara, menunjukkan kecenderungan mikrodelesi regio AZF dipengaruhi oleh perbedaan ras dan faktor lingkungan.<sup>5</sup>

Mikrodelesi termasuk dalam mutasi, perubahan sekuens nukleotida penyusun materi genetik yang disebabkan kesalahan replikasi materi genetik selama pembelahan sel.<sup>10</sup> Berdasarkan dampak yang ditimbulkan, mutasi dikelompokkan menjadi mutasi netral, buruk, baik, dan letal.<sup>11</sup> Sementara berdasarkan perubahan strukturnya, mutasi dibagi menjadi mutasi gen dan mutasi kromosom. Mutasi gen terdiri dari mutasi titik, delesi, dan insersi. Mutasi kromosom terdiri dari delesi, duplikasi, inversi, insersi, serta translokasi.<sup>10,11</sup>

Mikrodelesi regio AZF merupakan mutasi buruk dengan perubahan struktur berupa delesi yang tidak dapat dideteksi pada pemeriksaan sitogenik namun dapat dideteksi pada pemeriksaan molekuler.<sup>12</sup> Patogenesis mikrodelesi regio AZF diduga berupa adalah rekombinasi homolog pada sekuens palindrom berulang AZF yang beresiko tinggi mengalami kesalahan replikasi.<sup>5</sup>

Setiap makhluk hidup dapat mengalami mutasi spontan berupa tautomerisme, depurinisasi, deaminasi, transisi, dan transversasi. Selain itu, mutasi dapat juga diinduksi oleh pajanan mutagen, berupa mutagen kimia, oksidatif, radiasi, biologis, bahkan psikogenik.<sup>10</sup> Perbedaan pajanan mutagen inilah yang diduga menyebabkan perbedaan frekuensi dan kandidat gen pada regio AZF yang mengalami mikrodelesi pada beberapa penelitian pada beberapa negara.

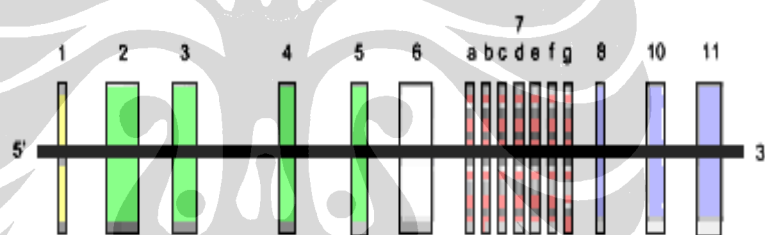
Tabel 5.2. Prevalensi relatif delesi regio AZFa, b, dan c pada pria infertil

<b>Regio Delesi</b>	<b>Prevalensi</b>	<b>%</b>
AZFa	13 /265	4,9
AZFb	42 /265	15,8
AZFc	158 /265	59,6
AZFa + b	4 /265	1,5
AZFb + c	22 /265	8,3
AZFa + b + c	10 /265	3,8
non AZF	16 /265	6,0

Walaupun terdapat variasi frekuensi dan kandidat gen, semua penelitian mendapatkan regio AZFc paling banyak ditemukan mengalami mikordelesi pada pria infertil dibandingkan regio AZFa maupun AZFb, yakni mencapai 70%.<sup>5</sup> Karena alasan inilah, dalam penelitian awal dengan pemilihan situs pemeriksaan yang terbatas, peneliti memilih pemeriksaan regio AZFc dan kandidat gennya.

Meskipun sekuens lengkap AZFc belum sepenuhnya diketahui, Beberapa kandidat gen regio AZFc telah diketahui, antara lain DAZ, CDY1, BPY2, PRY, TTY2.<sup>5</sup> Gen-gen pada AZFc memiliki kemiripan karakteristik, antara lain multi kopi yang terletak pada kromosom Y, spesifik pada kromosom Y, dan hanya diekspresikan pada testis.<sup>2,5</sup>

DAZ terletak pada bagian distal AZFc, merupakan kandidat gen yang paling sering ditemukan mengalami mikordelesi pada pria infertil.<sup>5</sup> DAZ merupakan multi gen dengan banyak kopi yang terkumpul pada regio AZFc.<sup>2,9</sup>



Gambar 5.1. Pemetaan skenatis regio AZFc<sup>5</sup>

Ekson 1 DAZ merupakan kodon inisiator, ekson 2 sampai 5 merupakan situs untuk berikatan dengan RNA, Sementara ekson 7 mengkode transkrip DAZ. DAZ ditranskripsi dan ditranslasi hanya pada sel germinal pada fase spermatid akhir dan spermatozoa sehingga mikordelesi DAZ menyebabkan tidak dapat dibentuknya protein yang diperlukan oleh spermatid sekunder dan spermatozoa, memberikan gambaran *spermatogenic arrest* pada pemeriksaan histopatologi.<sup>5</sup>

Selain *spermatogenic arrest*, fenotip dari mikordelesi AZFc adalah, sindroma sel sertoli, tipe I maupun tipe II, serta hipospermatogenesis kuantitatif yang intak secara kualitatif.<sup>4</sup> Patofisiologi dan hubungan fenotip-genotip pada mikordelesi AZF belum sepenuhnya dipahami karena pemetaan sekuens lengkap AZFc belum diketahui.



Walaupun DAZ bukan satu-satunya kandidat gen yang ada pada regio AZFc bagian distal, tingginya prevalensi delesi DAZ pada pria infertil menjadikan DAZ kandidat gen utama pada regio AZFc. Hal ini diperkuat oleh homologi DAZ dengan gen penyebab infertilitas *Drosophila* jantan, *boule*.<sup>5</sup>

Fungsi kandidat gen lain pada regio AZFc seperti CDY1, BPY2, PRY, TTY2 belum diketahui. Dugaan dibuat berdasarkan lokasi kandidat gen dalam regio AZFc.<sup>2,5</sup> CDY terletak pada kluster DAZ dan sering hilang pada delesi DAZ sehingga bersama DAZ menjadi kandidat gen untuk regio AZF. Namun PRY dan TTY2 yang terletak pada regio proksimal AZFc, diduga tidak berhubungan langsung dengan proses spermatogenesis.<sup>5</sup>

Penelitian dengan judul “Pemeriksaan mikrodelesi kromosom Y pria oligozoospermia menggunakan *sequences tagged sites* sY14, sY239, sY242, sY254, sY255, dan sY1196 di Jakarta tahun 2007-2008” merupakan penelitian awal dengan pemilihan situs pemeriksaan yang terbatas, penelitian ini menggunakan STS uji yang mendeteksi kandidat gen DAZ, karena DAZ merupakan kandidat gen utama regio yang paling sering mengalami mikrodelesi pada kromosom Y.

Tabel 5.3. STS uji, kandidat gen, dan ukuran produk penelitian

No	STS Uji	Kandidat Gen	Ukuran Produk
1	sY14	SRY	472 bp
2	sY239	DAZ	200 bp
3	sY242	DAZ	233 bp
4	sY254	DAZ	107 bp
5	sY255	DAZ	126 bp
6	sY1196	DAZ	394 bp

Kandidat gen SRY yang terletak pada lengan pendek kromosom Y merupakan gen yang menentukan perkembangan testis, diperiksa pada penelitian ini, berperan menjadi kontrol positif internal. Sementara STS uji lainnya memeriksa regio-regio spesifik DAZ.<sup>9</sup>

Prinsip pemeriksaan adalah isolasi DNA pria infertil yang menderita oligozoospermia berat, diutamakan pasien yang melakukan pemeriksaan histopatologis jaringan testis untuk menganalisis hubungan fenotip-genotip. Langkah berikutnya adalah amplifikasi DNA menggunakan STS uji spesifik, menghasilkan fragmen pendek DNA. Ukuran fragmen pendek DNA diperiksa menggunakan elektroforesis gel agarose, kemudian divisualisasikan dibawah uv transiluminator ataupun dengan menggunakan kamera polaroid.<sup>17,18,19,21</sup>

Hasil positif ditegakkan apabila ditemukan pita yang menandakan fragmen DNA dengan ukuran spesifik, sesuai dengan STS uji yang digunakan, pada visualisasi hasil elektroforesis. Hasil negatif berarti tidak ditemukan pita yang menandakan fragmen DNA dengan ukuran spesifik, sesuai dengan STS uji yang digunakan, pada visualisasi hasil elektroforesis pada tiga kali pemeriksaan.<sup>21</sup>

Hasil negatif palsu dapat disebabkan oleh konsentrasi DNA terlalu rendah, kesalahan sekuens STS uji yang digunakan, serta kesalahan dalam proses pembuatan. Untuk pemeriksaan ini, DNA diperlukan dalam konsentrasi minimal 10 piko molar. Kemungkinan kesalahan proses pembuatan dihindari dengan pengulangan pemeriksaan dengan hasil negatif sebanyak tiga kali. Sementara STS uji diperiksa dengan sekuensing DNA dilakukan di Lembaga Eijkmann Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo (RSUPRN-CM).

Tidak ada ketentuan jumlah sampel minimal dalam penelitian genetika. Pada penelitian ini, besar sampel ditentukan berdasarkan ketentuan studi polimorfisme, yaitu minimal 100 alel yang sebanding dengan 50 sampel. Penelitian ini menggunakan 70 sampel yang memenuhi ketentuan tersebut.<sup>23</sup>

Hasil penelitian dengan judul “Pemeriksaan mikordelesi kromosom Y pria oligozoospermia menggunakan *sequences tagged sites* sY14, sY239, sY242, sY254, sY255, dan sY1196 di Jakarta tahun 2007-2008” menunjukkan bahwa ditemukan mikordelesi pada pria infertil di Indonesia sejumlah 4,3%. Namun, hasil tersebut belum tentu menggambarkan keseluruhan mikordelesi yang terjadi karena hanya menggunakan lima primer untuk mendeteksi regio DAZ.

Peneliti berharap akan ada penelitian lanjutan yang mencakup seluruh STS yang terdapat pada regio AZF dan dengan jumlah sampel yang banyak agar dapat hubungan mikrodelesi regio AZF dengan infertilitas pada pria di Indonesia.

Jika penelitian lanjutan tersebut memperoleh hasil yang signifikan, pemeriksaan mikrodelesi regio AZF dapat dijadikan alat diagnostik genetik untuk memastikan bahwa faktor genetik merupakan penyebab infertilitas pada pria Indonesia. Karena pemeriksaan mikrodelesi kromosom lebih mudah, cepat dan relatif tidak invasif jika dibandingkan dengan pemeriksaan biopsi testis yang digunakan saat ini.

Pria infertil yang telah dipastikan mengalami mikrodelesi pada regio AZF juga tidak memerlukan pemeriksaan biopsi testis untuk melihat keadaan histopatologis testis dan tidak memerlukan terapi hormonal untuk merangsang spermatogenesisnya karena pria tersebut telah kehilangan gen yang mengontrol proses spermatogenesisnya.<sup>5</sup>

Selain itu, walaupun fenotip mikrodelesi AZF seperti *spermatogenic arrest*, sindroma sel sertoli tipe I, sindroma sel sertoli tipe II, atau hipospermatogenesis yang merupakan kandidat yang baik untuk fertilisasi buatan. Pria infertil telah dipastikan mengalami mikrodelesi pada regio AZF harus mempertimbangkan tentang mewariskan 'gen infertil' kepada anak laki-lakinya. Untuk alasan ini, diperlukan konseling genetik bagi penderita infertilitas akibat mikrodelesi regio AZFc yang ingin mendapatkan anak dengan fertilisasi buatan.