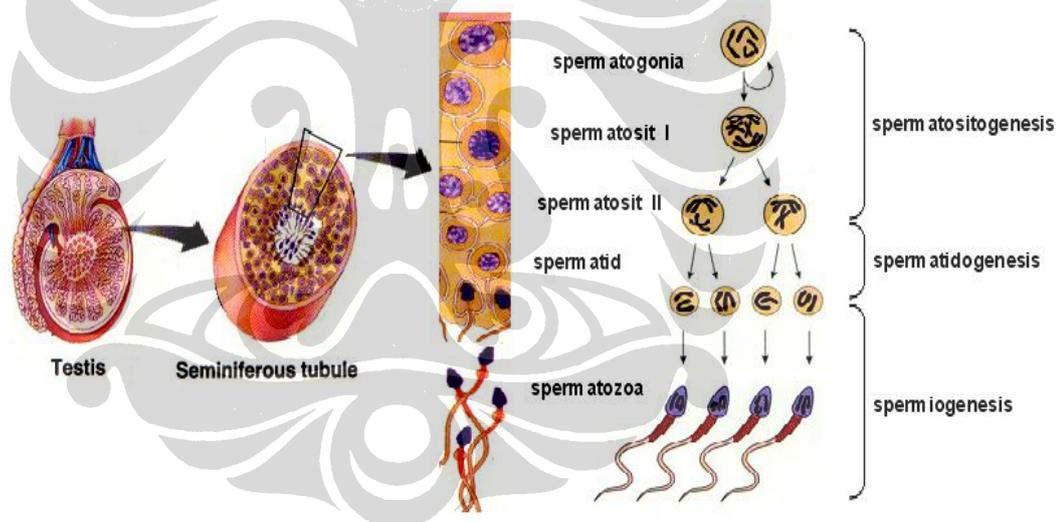


BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Spermatogenesis

Tubulus seminiferus sepanjang 250 meter dikemas dalam testis. Di dalam lapisan tubulus seminiferus terdapat sel-sel germinal dan sel-sel sertoli yang berperan dalam spermatogenesis, proses perubahan spermatogonia menjadi spermatozoa.⁶ Pada pemeriksaan mikroskopis didapatkan proses spermatogenesis dimulai dari lapisan terluar tubulus seminiferus menuju lapisan yang lebih dalam dan akhirnya mencapai lumen dimana sel-sel spermatozoa matur dilepaskan. Satu siklus spermatogenesis memerlukan waktu selama enam puluh empat hari dan melalui tiga fase, antara lain spermatositogenesis, spermatidogenesis, dan spermiogenesis.⁷



Gambar 2.1. Lokasi dan tahap-tahap spermatogenesis⁶

2.1.1. Spermatositogenesis

Spermatositogenesis merupakan pembentukan spermatosit sekunder dari spermatogonium. Spermatogonium pada dinding terluar tubulus seminiferus membelah secara mitotik menghasilkan satu spermatogonium dan satu spermatogonia. Spermatogonia kemudian membelah secara mitotik menghasilkan spermatosit primer. Spermatosit primer membelah secara meiosis menghasilkan spermatosit sekunder.⁷

2.1.2. Spermatidogenesis

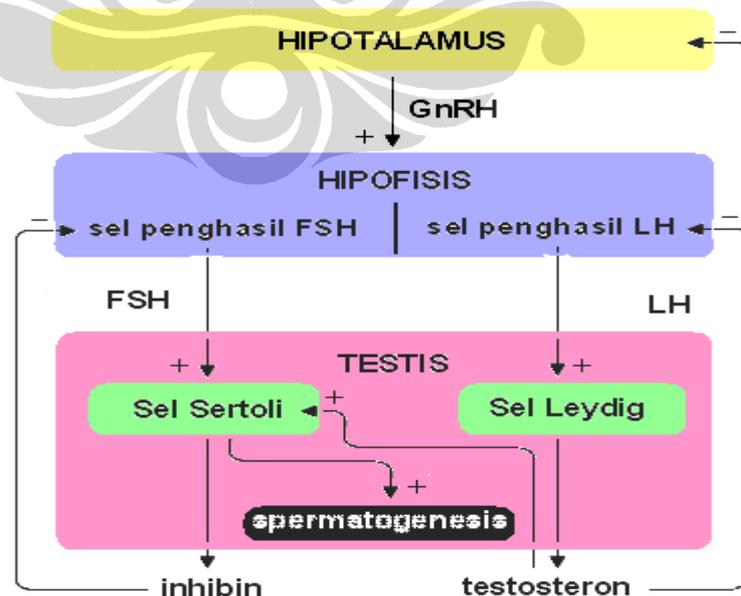
Spermatidogenesis merupakan pembentukan spermatid dari spermatosit sekunder. Spermatosit sekunder membelah secara meiosis untuk kedua kali, menghasilkan spermatid.⁷

2.1.3. Spermiogenesis

Spermiogenesis merupakan pematangan spermatid menjadi spermatozoa matur. Proses pematangan terdiri dari pengemasan *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan pembentukan akrosom, pembentukan axonem, dan pembentukan ekor.⁶ Satu spermatogonia akan menghasilkan empat spermatozoa yang akan tetap berhubungan melalui jembatan sitoplasmik sampai proses pematangan spermatozoa selesai.^{6,7}

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.^{6,7} Sel sertoli juga menghasilkan cairan testis, substansi yang menginisiasi meiosis, inhibin, protein pengikat androgen, serta hormon antimullerian.⁶



Gambar 2.2. Kontrol hormonal spermatogenesis⁶

2.1.5. Kontrol Hormonal Spermatogenesis

Spermatogenesis terjadi akibat interaksi hipotalamus, hipofisis, dan sel Leydig. Hipotalamus menghasilkan *Gonadotropine realising hormone* (GnRH), menyebabkan hipofisis anterior menghasilkan *Follicle stimulating hormone* (FSH) dan *Luteinizing hormone* (LH).⁶

FSH meningkatkan aktivitas sel sertoli sementara LH mengakibatkan sel leydig menghasilkan testosteron, keduanya memberikan stimulus positif terhadap proses spermatogenesis. Stimulus negatif untuk proses spermatogenesis diperankan oleh inhibin dan testosteron. Inhibin dihasilkan sel sertoli mengurangi produksi FSH hipofisis anterior.

Testosteron, selain meningkatkan aktivitas spermatogenesis, juga memberikan stimulus negatif dengan menurunkan produksi LH hipofisis anterior dan mengurangi produksi GnRH hipotalamus.^{6,7}

2.2. Infertilitas

Infertilitas adalah ketidakmampuan menghasilkan kehamilan setelah satu tahun melakukan hubungan seksual normal tanpa upaya untuk mencegah kehamilan. 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.¹

2.2.1. Infertilitas pada Pria

Penyebab infertilitas pada pria dibagi menjadi penyebab pre-testikuler, penyebab testikuler, dan penyebab pos-testikuler.¹ Penyebab pre-testikuler dapat berupa gangguan pada aksis hipotalamus-hipofisis atau gangguan organ perifer yang mengganggu keseimbangan hormonal tubuh.⁶

Penyebab testikuler dapat berupa gangguan kualitas semen, gangguan genetik pada kromosom Y, dan gangguan struktural pada testis karena trauma, infeksi, ataupun neoplasma. Sementara penyebab pos-testikuler dapat berupa gangguan saluran keluar ejakulat ataupun gangguan kemampuan ejakulasi.¹

Pemeriksaan penunjang untuk membantu menegakkan diagnosis infertilitas pada pria adalah analisis semen, pemeriksaan darah tepi untuk menilai kadar hormon dan keadaan kromosom Y.^{1,8}

2.2.2. Analisis Semen

Analisis semen merupakan pemeriksaan terhadap karakter semen dan spermatozoa yang terkandung didalam cairan ejakulat. Pemeriksaan ini dilakukan untuk membantu menegakkan diagnosis infertilitas pada pria dan memeriksa keberhasilan prosedur vasektomi.⁸

Pengambilan sampel untuk analisis semen dapat dilakukan dengan cara masturbasi, hubungan seksual menggunakan kondom, *koitus interruptus*, serta *percutaneous epididimal sperm aspiration* (PESA) atau *trans epididimal sperm extraction* jika terdapat sumbatan pada saluran vas deferens.^{1,8} Pemeriksaan dilakukan paling lama satu jam setelah pengambilan sampel dilakukan.⁸

Analisis semen terdiri dari pemeriksaan makroskopis dan mikroskopis. Pemeriksaan makroskopis dilakukan untuk menilai volume, viskositas, keasaman, warna, dan likuifaksi ejakulat. Pemeriksaan mikroskopis dilakukan untuk menilai konsentrasi, motilitas, morfologi, viabilitas, dan integritas membran sel sperma.⁸



Gambar 2.3. Pemeriksaan makroskopis analisis semen⁸

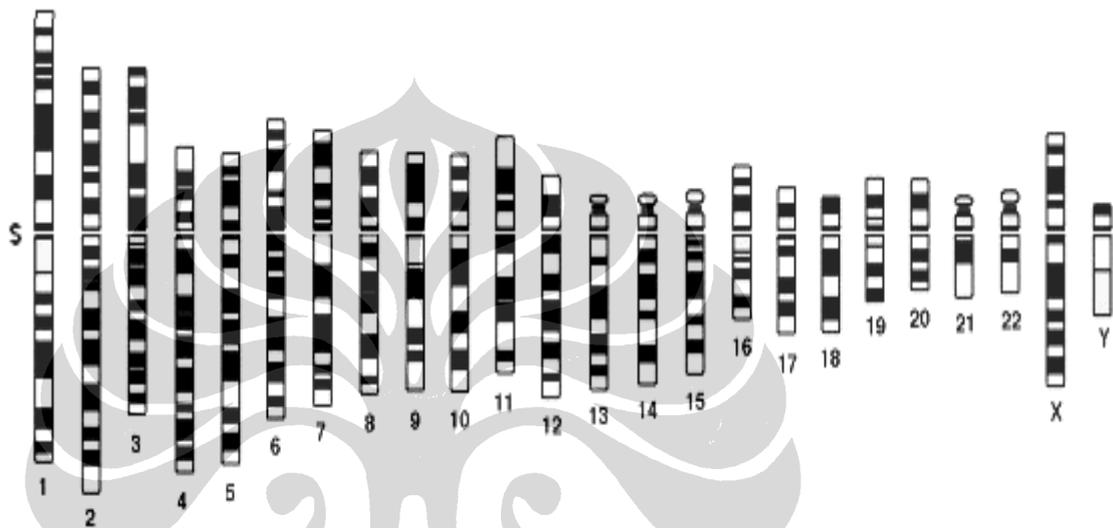
2.2.3. Konsentrasi Spermatozoa

Normozoospermia adalah konsentrasi sel sperma lebih dari 20 juta tiap mililiter cairan ejakulat. Oligozoospermia adalah konsentrasi sel sperma kurang dari 20 juta tiap mililiter cairan ejakulat. Oligozoospermia berat adalah konsentrasi sel sperma kurang dari 5 juta tiap mililiter cairan ejakulat. Sementara Azoospermia adalah tidak ditemukannya sel sperma dalam cairan ejakulat.⁸

Berkurangnya konsentrasi sel sperma dapat disebabkan oleh gangguan obstruktif dimana proses spermatogenesis berlangsung normal dan gangguan non-obstruktif disebabkan dimana proses spermatogenesis terganggu.¹ Faktor lain yang dapat berpengaruh terhadap berkurangnya konsentrasi sel sperma dalam cairan ejakulat adalah keadaan medis umum, diet, serta frekuensi ejakulasi.⁸

2.3. Kromosom Y

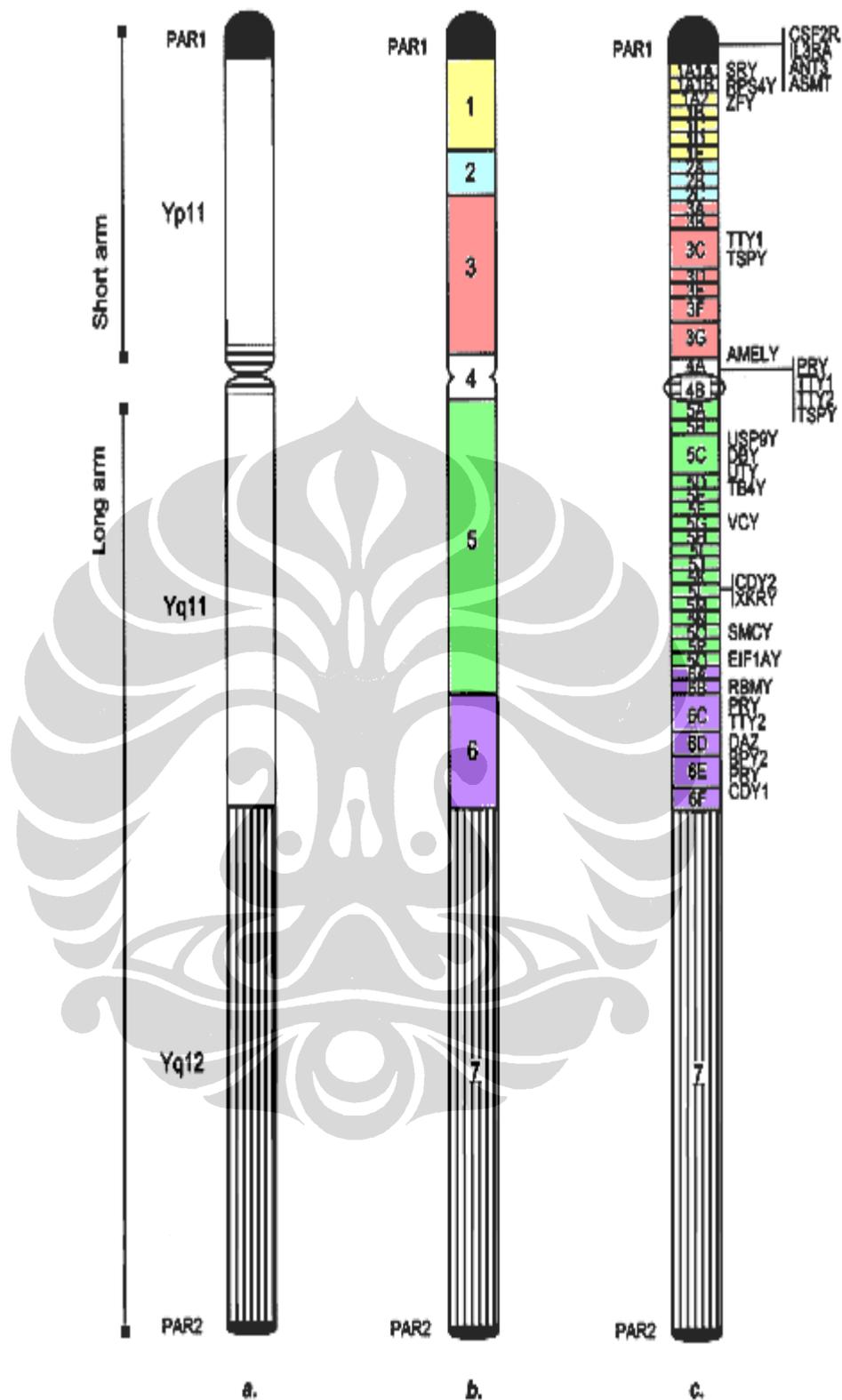
Kromosom Y merupakan kromosom manusia paling kecil yang berukuran sekitar 60 Mb.² Pengamatan sitogenetik menggunakan teknik *chromosome banding* membagi kromosom Y terdiri dari regio pseudoautosomal (PAR), terdiri atas PAR1 dan PAR2, dan regio *nonrecombining regio of Y chromosome* (NRY), terdiri atas daerah terang (eukromatik) dan gelap (heterokromatik).^{2,5,9}



Gambar 2.4. Kromosom manusia⁹

PAR merupakan bagian kromosom Y yang berpasangan dengan kromosom X selama proses meiosis.^{2,5} 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.^{2,5,9}

Pemetaan molekular kromosom Y pertama kali dilakukan oleh Vergnaud *et al*, membagi kromosom Y menjadi tujuh interval di luar PAR.⁵ 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.^{5,9} Pemetaan Vollrath *et al* inilah yang paling banyak digunakan sampai sekarang.⁵



Gambar 2.5. Pemetaan Kromosom Y⁵

- Pengamatan kromosom Y dengan teknik *banding chromosome*
- Tujuh interval pemetaan kromosom Y menurut Vergnaud
- Empat puluh tiga subinterval pemetaan kromosom Y menurut Vollrath

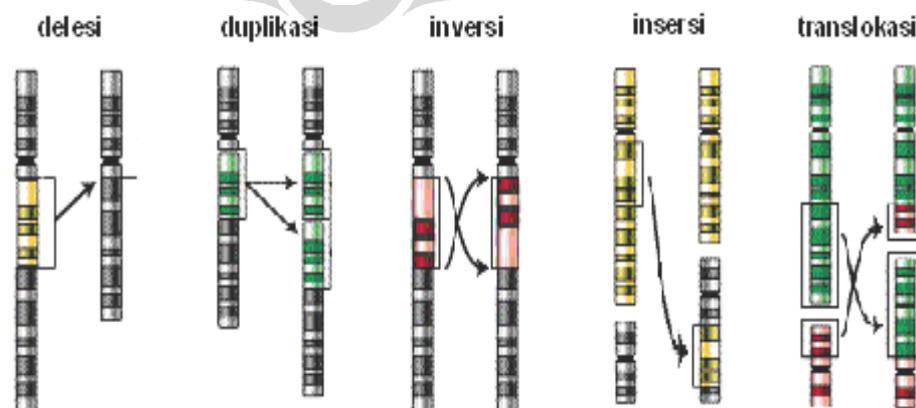
Lebih dari 30 gen berhasil diidentifikasi pada kromosom Y. Gen-gen tersebut diklasifikasikan menjadi tiga kelompok berdasarkan lokasinya pada kromosom Y dan pola ekspresinya.^{2,5} Kelompok pertama adalah gen pseudoautosomal homolog X yang terletak pada PAR dan diekspresikan pada seluruh tubuh, antara lain *CSF2RA*, *IL3RA*, *ANT3*, dan *ASMT*.⁵

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*.⁵ 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*.⁵

2.4. Mutasi Genetik

Mutasi adalah perubahan sekuens nukleotida penyusun materi genetik.¹⁰ Mutasi terjadi karena kesalahan pada saat replikasi materi genetik selama pembelahan sel. Mutasi dapat terjadi spontan akibat tautomerisme, depurinisasi, deaminasi, transisi, dan transversi. Dapat pula diinduksi oleh mutagen kimia, stresor oksidatif, radiasi ultraviolet maupun pengion, serta infeksi virus.^{10,11}

Berdasarkan dampak yang ditimbulkan, mutasi dikelompokkan menjadi mutasi netral, mutasi buruk, mutasi baik, dan mutasi letal.¹¹ Sementara berdasarkan perubahan strukturnya, mutasi dibagi menjadi mutasi gen dan mutasi kromosom.¹⁰ Mutasi gen terdiri dari mutasi titik, delesi, dan insersi. Mutasi kromosom terdiri dari delesi, duplikasi, inversi, insersi, serta translokasi.¹⁰



Gambar 2.6. Mutasi tingkat kromosom¹¹

Mikrodelesi adalah delesi satu atau lebih nukleotida dari DNA yang tidak tampak pada pemeriksaan sitologis.¹⁰ Deteksi mikrodelesi memerlukan pemeriksaan molekuler menggunakan *Sequences Tagged Sites - Polymerase Chain Reaction* (STS-PCR).¹²

2.5. Azoospermia Factor (AZF)

Hubungan delesi kromosom Y dengan infertilitas pada pria pertama kali dicetuskan oleh *Tiepollo* dan *Zuffardi* pada tahun 1976.^{2,5,12} Dalam suatu penelitian, *Tiepollo* dan *Zuffardi* 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).^{5,12}

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.^{5,12} Mikrodelesi tidak dapat dideteksi pada pemeriksaan sitogenik namun dapat dideteksi pada pemeriksaan molekuler menggunakan *Sequences Tagged Sites - Polymerase Chain Reaction* (STS-PCR).¹²

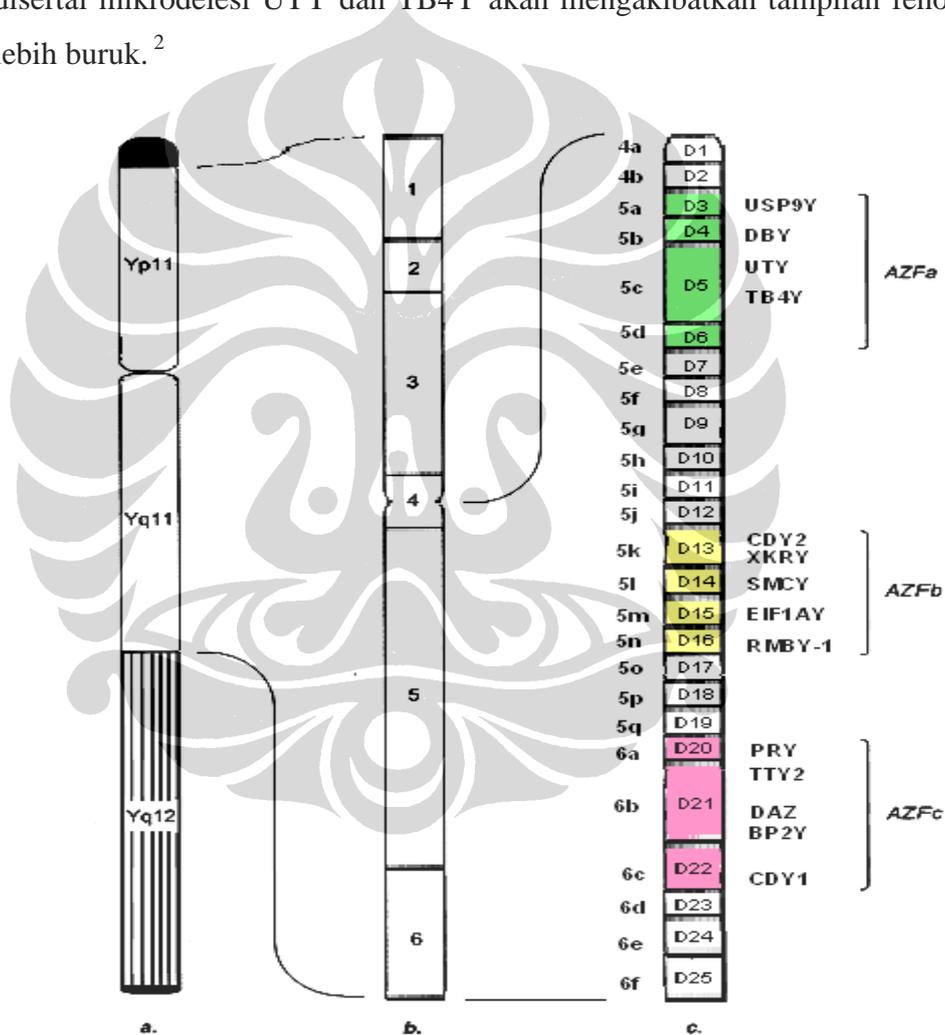
Analisis molekuler lebih lanjut oleh *Vollrath et al* menunjukkan daerah eukromatik kromosom Y tersusun atas 43 subinterval, 25 diantaranya terletak pada Yq11. Dalam 25 subinterval Yq11 (D1 - D25) terdapat tiga regio yang sering mengalami mutasi pada pria infertil. Lokus-lokus tersebut dinamakan AZFa yang terletak antara regio D3-D6, AZFb yang terletak antara regio D13-16, dan AZFc yang terletak antara regio D20-D2.^{4,5}

2.5.1. Azoospermia Factor A dan Gen Kandidatnya

AZFa terletak pada regio proksimal Yq11, tepatnya subinterval D3-D6 menurut pemetaan *Vollrath*.⁹ Beberapa kandidat gen telah berhasil diidentifikasi pada regio ini, antara lain: *Ubiquitin Specific Protease 9 Y* (USP9Y), *Dead Box on the Y* (DBY), *Ubiquitous TPR motif on the Y* (UTY), dan *Tymosin B4Y isoform* (TB4Y).^{2,13}

Kandidat gen lainnya dan kerja masing-masing gen secara pasti masih dipelajari, tapi secara umum USP9Y dan DBY berperan dalam proses spermatogenesis, sementara UTY dan TB4Y berperan dalam menjaga kehidupan sel.^{2,5,13} USP9Y dan DBY merupakan kandidat gen yang paling sering mengalami mikrodlesi pada AZFa.^{2,5}

Mikrodlesi USP9Y dan DBY menyebabkan sindroma sel sertoli dimana sel sertoli ditemukan dalam jumlah normal namun sel germinal sangat berkurang (tipe II) atau tidak ada sama sekali (tipe I).¹⁴ Mikrodlesi USP9Y dan SBY yang disertai mikrodlesi UTY dan TB4Y akan mengakibatkan tampilan fenotip yang lebih buruk.²



Gambar 2.7. Regio AZF dalam kromosom Y

- pengamatan kromosom Y dengan teknik *banding chromosome*
- daerah eukromatik pemetaan kromosom Y menurut Vergnaud, terdiri dari regio Yp11 dan Yq11 yang dibagi menjadi 6 interval.
- Yq11 menurut pemetaan Vollrath, terdiri dari 25 subinterval. AZFa pada D3-6, AZFb pada D13-D16, dan AZFc pada D20-D22

2.5.2. Azoozpermia Factor B dan Gen Kandidatnya

AZFb terletak pada regio medial Yq11, tepatnya subinterval D13-D16 menurut pemetaan Vollrath.⁹ Beberapa kandidat gen telah berhasil diidentifikasi pada regio ini, antara lain: *RNA binding motif on the Y 1* (RMBY-1), *Chromodomain Y 2* (CDY2), *XK related Y* (SKRY), *eucaryotic translation initiation factor 1A on the Y* (EIF1AY), dan *selected mouse cDNA on the Y* (SMCY).^{2,5,12}

RMBY-1 merupakan subfamili dari *RBMV genes family* yang terletak pada regio AZFb, berperan mengkode protein yang membantu perkembangan spermatogonia dan spermatisit sebelum mengalami pembelahan meiosis. RMBY-1 merupakan kandidat gen yang paling sering mengalami mikordelesi pada AZFb. Mikordelesi RMBY-1 mengakibatkan *spermatogenesis arrest* pada tahap sebelum meiosis, ditandai dengan ditemukannya spermatogonia dan spermatisit primer, namun tidak ditemukan spermatisit sekunder, spermatid, maupun spermatozoa dalam tubulus seminiferus.^{5,12,15}

EIF1AY diekspresikan spesifik pada testis dan berperan mengkode faktor inisiasi translasi. Mikordelesi RMBY-1 yang disertai mikordelesi EIF1AY akan mengakibatkan fenotip yang lebih buruk.^{2,5} XKRY dan CDY diekspresikan spesifik pada testis dan sering ditemukan mengalami mikordelesi pada pria infertil namun cara kerja gen tersebut secara pasti masih dipelajari.²

2.5.3. Azoozpermia Factor C (AZF C) dan Gen Kandidatnya

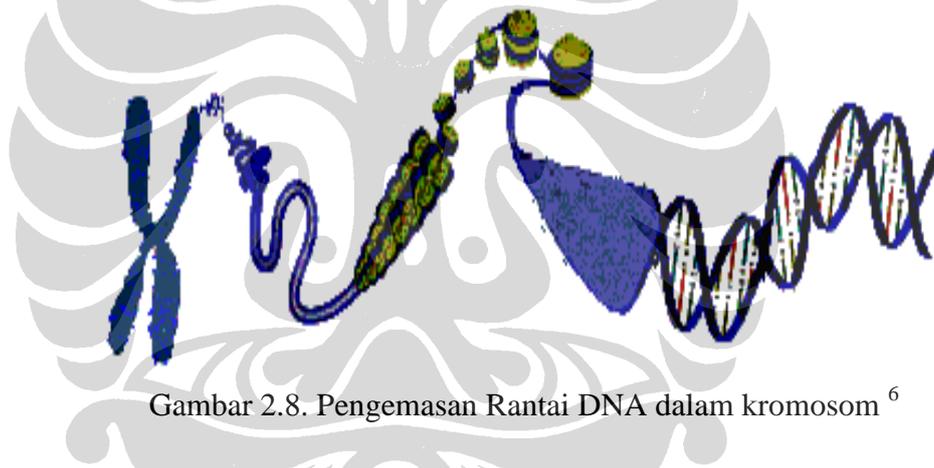
AZFc terletak pada regio distal Yq11, tepatnya subinterval D20-D25 menurut pemetaan Vollrath.⁹ Beberapa kandidat gen telah berhasil diidentifikasi pada regio ini, antara lain: *deleted in azoospermia* (DAZ), *chromodomain Y 1* (CDY1), *basic protein Y 2* (BPY2), *PTA-BL related Y* (PRY), *testis transcript Y 2* (TTY2).^{2,5,12}

DAZ, gen yang paling sering mengalami mikordelesi pada AZFb, memiliki struktur yang mirip dengan RBMY, berperan mengkode protein yang membantu perkembangan spermatogonia dan spermatisit sebelum mengalami pembelahan meiosis. AZF dan CDY1 merupakan kandidat gen yang paling bertanggung jawab terhadap fenotip pria dengan mikordelesi AZFb.⁵

Gen lain yang diduga turut berperan dalam fenotip mikrodeselesi AZFc adalah BP2Y, PRY, dan TTY2. Namun cara kerja secara pasti masing-masing kandidat gen tersebut masih dipelajari.⁵ Mikrodeselesi regio AZFc menyebabkan fenotip yang bervariasi dari sindroma sel sertoli baik tipe I maupun tipe II, *spermatogenesis arrest*, maupun kecacatan bentuk sperma.^{5,12}

2.6. Ekstraksi *Deoxyribonucleic Acid*

Deoxyribonucleic Acid (DNA) merupakan rantai ganda polimer linier, tersusun atas monomer berupa nukleotida, berperan sebagai kode informasi genetik suatu makhluk hidup.^{16,17} Rantai DNA dikemas dalam kromosom dan diperoleh dari sel yang memiliki inti, seperti sel darah putih, epitel kulit, akar rambut, serta spermatozoa.¹⁶

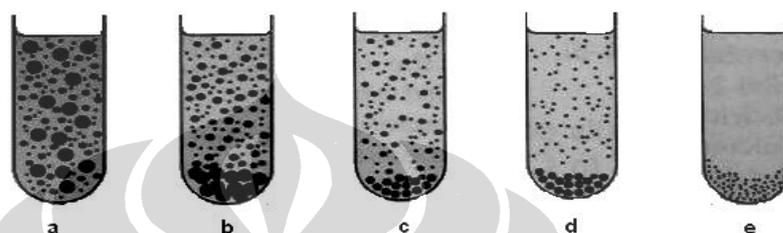


Gambar 2.8. Pengemasan Rantai DNA dalam kromosom⁶

Teknik isolasi DNA meliputi menghancurkan dinding sel menggunakan *cell lysis solution*, menghancurkan dinding nukleus dengan *nuclei lysis solution*, membersihkan debris protein dengan *protein precipitation solution*, serta mengendapkan DNA dengan isopropanol.¹⁷

Cell lysis solution dan *nuclei lysis solution* berperan untuk mengeluarkan DNA dari dalam inti sel. *Protein precipitation solution* berperan mengendapkan protein agar DNA yang akan diekstraksi tidak terkontaminasi oleh protein. isopropanol berperan untuk melarutkan lemak dan garam larut alkohol dan mengendapkan DNA.¹⁷

DNA dipisahkan dari debris jaringan dan protein dengan sentrifugasi dengan landasan bahwa debris sel dan protein dengan besar molekul lebih besar akan mengendap dengan sentrifugasi. Selanjutnya pemberian isopropanol akan melarutkan garam alkohol dan mengendapkan DNA. Setelah DNA mengendap, supernatan kemudian dibuang dan didapatkan endapan DNA yang bebas dari kontaminasi debris sel, protein, ataupun substansi lain.^{16,17}



Gambar 2.9. Tahap-tahap isolasi DNA¹⁶

- a. campuran berisi debris sel, protein, dan DNA
- b. debris sel diendapkan, supernatan berisi protein dan DNA
- c. protein besar diendapkan, supernatan berisi protein kecil dan DNA
- d. protein kecil diendapkan, supernatan berisi DNA
- e. DNA diendapkan

DNA yang diekstraksi diperiksa kemurniannya menggunakan spektrofotometri dengan membandingkan penyerapan cahaya UV pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA menyerap cahaya UV dengan panjang gelombang 260 nm dan 280 nm sementara protein hanya menyerap cahaya UV dengan panjang gelombang 280 nm. Sampel DNA yang murni memiliki rasio 260/280 diatas 1,8 sementara sampel DNA yang terkontaminasi protein memiliki rasio 260/280 kurang dari 1,8.¹⁶

2.7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik *in vitro* untuk mensintesis asam nukleat dengan cara mereplikasi atau mengamplifikasi suatu segmen DNA yang spesifik.¹⁸ Metode ini memerlukan, sepasang primer yang berpasangan, enzim polimerase, *deoxynucleoside triphosphates* (dNTP), larutan buffer, dan kation bivalen (magnesium).

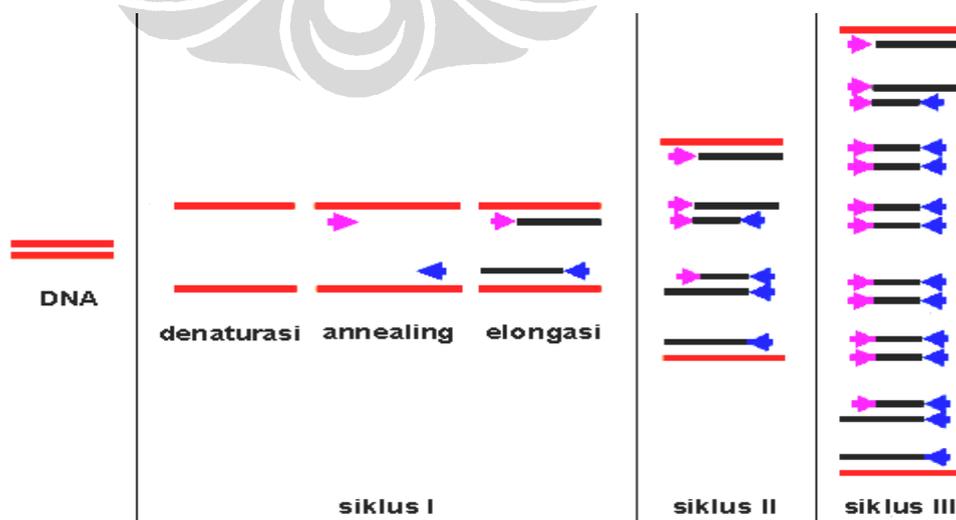
Semua bahan dicampurkan dan ditempatkan dalam tabung khusus, lalu mesin PCR diprogram dengan menyesuaikan temperatur tahapan denaturasi

(*denaturation*), pemasangan primer (*annealing*), dan ekstensi (*elongation*) sesuai dengan primer yang digunakan.¹⁹

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.¹⁸

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.^{18,20} Pemasangan primer memerlukan suhu yang berbeda dari setiap primer. Semakin banyak gugusan guanin atau sitosin yang membentuk tiga ikatan hidrogen dengan segmen DNA dalam satu primer, semakin tinggi suhu yang diperlukan.²⁰

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.^{19,20} 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.²⁰ Hasil PCR dapat langsung dinilai menggunakan elektroforesis atau disimpan pada suhu 4 ° C.¹⁹



Gambar 2.10. Tahap-tahap PCR²⁰

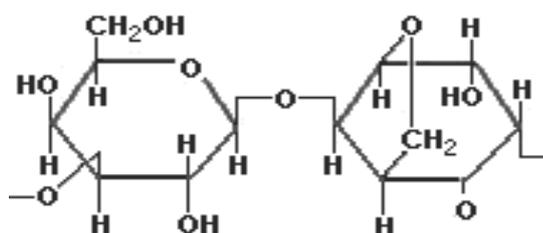
Primer merupakan rantai asam nukleat yang berperan sebagai titik permulaan untuk replikasi DNA. Primer mutlak diperlukan karena enzim DNA polimerase hanya dapat menambahkan nukleotida pada strand DNA yang telah terbentuk. Primer yang sering digunakan untuk keperluan biologi molekuler biasanya merupakan oligonukleotida yang disintesis secara kimiawi dengan ukuran 20 – 30 pasang basa.¹⁸

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.¹⁸ 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 – 8,0.¹⁹

Sementara magnesium selain diperlukan dNTP dan DNA untuk melalui fase pemasangan primer dan pemanjangan dengan baik, juga diperlukan oleh enzim polimerase untuk dapat bekerja dengan baik.¹⁹

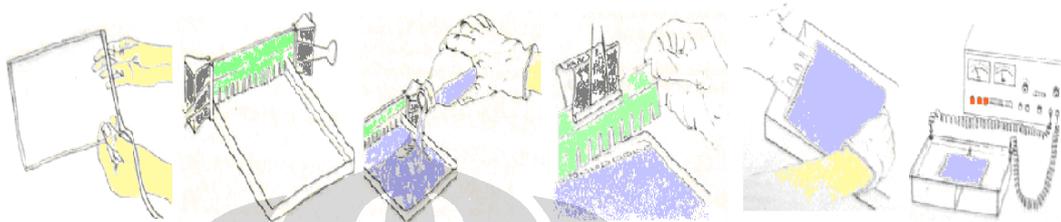
2.8. Elektroforesis Gel Agarose

Elektroforesis gel agarose merupakan suatu teknik untuk memisahkan fragmen DNA, RNA, atau molekul protein menggunakan arus listrik yang dilewatkan pada matriks gel berdasarkan ukuran molekulnya.²¹ Agarose diekstraksi dari rumput laut, merupakan polimer linier yang tersusun atas dimer berupa D-galaktose-O-3,6-anhidro-L-galaktose. Gel agarose dihasilkan dengan melarutkan dan memanaskan bubuk agarose dalam larutan buffer. Larutan kemudian dituang ke dalam cetakan dan dibiarkan mengeras. Setelah mengeras, agarose membentuk matriks.²¹



Gambar 2.11. Dimer agarose²¹

Ketika medan listrik dialirkan sepanjang gel, DNA yang bermuatan negatif pada pH netral akan bermigrasi ke arah anoda. Kecepatan migrasi DNA dipengaruhi oleh beberapa parameter seperti ukuran DNA, konsentrasi agarose, konformasi DNA, arah medan listrik, pewarna yang digunakan, dan komposisi buffer elektroforesis.²¹



Gambar 2.12. Persiapan elektroforesis gel²¹

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 sehingga penggunaannya memerlukan perhatian yang lebih.²¹

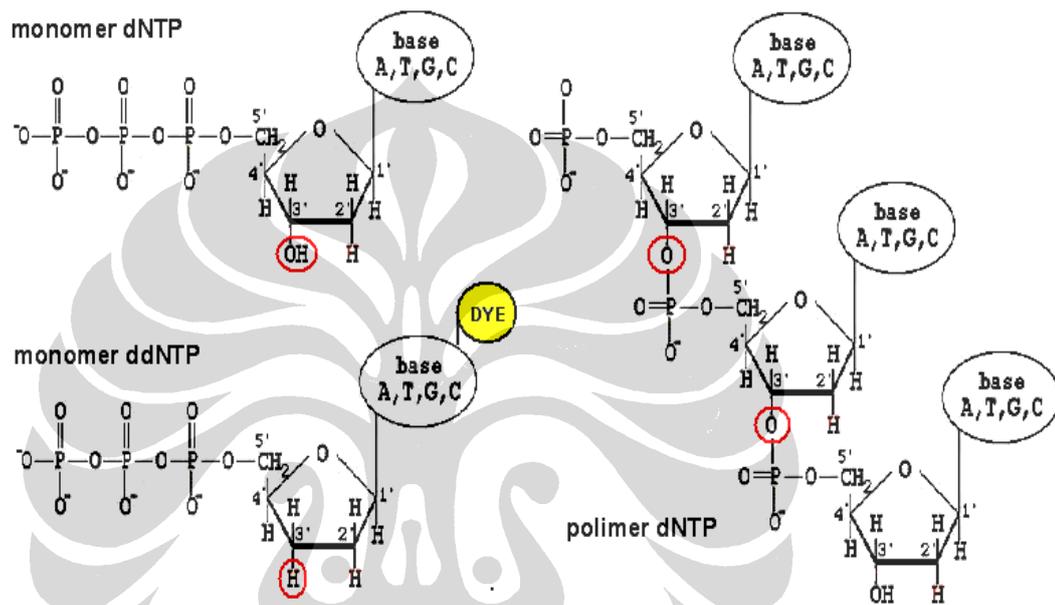
2.9. Pengurutan Basa DNA dengan Metode Terminasi Rantai

Pengurutan basa DNA merupakan suatu teknik untuk menentukan urutan basa nukleotida yang menyusun RNA atau DNA. Pemeriksaan ini melalui tahap PCR, tahap elektroforesis gel, dan tahap pembacaan sekuens DNA.²²

Pada tahap PCR, campuran PCR ditambahkan dengan *dideoxynucleotides triphosphate* (ddNTP) yang telah diberi label untuk menghentikan fase pemanjangan pada tahap PCR dan visualisasi basa nukleotida pada tahap pembacaan sekuens DNA.

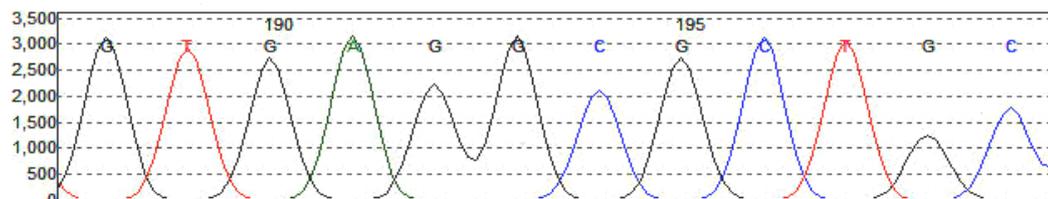
Hasil PCR berupa fragmen-fragmen DNA dengan panjang yang berbeda, masing-masing memiliki ddNTP yang telah dilabel pada bagian ujung 3'.²² ddNTP merupakan dNTP yang tidak memiliki gugus 3'-OH yang diperlukan untuk membentuk ikatan fosfodiester dalam polimerisasi dNTP. Pemberian ddNTP mengakibatkan terhentinya proses pemanjangan ketika ddNTP diikat oleh rantai DNA yang sedang dibentuk.²²

Pada tahap elektroforesis gel, fragmen-fragmen DNA hasil PCR dipisahkan menggunakan medan listrik dalam media gel poliakrilamid.²¹ Gel poliakrilamid adalah media paling baik untuk memisahkan fragmen kecil DNA dengan akurasi sangat tinggi sampai perbedaan ukuran satu pasang basa nukleotida.²¹ Tiap-tiap pita hasil elektroforesis gel mengandung satu jenis ddNTP dengan label fluoresennya.^{21, 22}



Gambar 2.13. Monomer dNTP, monomer ddNTP, dan polimer dNTP²²

Pada tahap pembacaan sekuens DNA, fluoresen yang dilabel pada tiap jenis ddNTP akan memancarkan panjang gelombang yang berbeda. panjang gelombang akan ditangkap oleh penganalisa sekuens DNA otomatis, menghasilkan urutan basa nukleotida penyusun fragmen DNA.²²



Gambar 2.14. Skema sekuens DNA metode terminasi rantai²²