

**DISTRIBUSI GEN *AZOOSPERMIA FACTOR* (AZF)
PADA PASIEN DENGAN HIPOSPADIA**

***DISTRIBUTION OF AZOOSPERMIA FACTOR (AZF) GENE
IN PATIENTS WITH HYPOSPADIAS***



**Tesis
untuk memenuhi sebagian persyaratan
mencapai derajat Sarjana S-2**

Magister Ilmu Biomedik

**Joko Malis Sunarno
G4A006008**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2009**

TESIS

DISTRIBUSI GEN *AZOOSPERMIA FACTOR* (AZF)
PADA PASIEN DENGAN HIPOSPADIA

disusun oleh :
Joko Malis Sunarno
G4A006008

Telah dipertahankan di depan Tim Penguji
pada tanggal 22 Januari 2009
dan dinyatakan telah memenuhi syarat untuk diterima

Menyetujui,
Komisi Pembimbing

Pembimbing utama

Pembimbing kedua

dr. Tri Indah Winarni, MSi.Med
NIP. 132 163 892

Prof. dr. Sultana MH Faradz, PhD
NIP. 130 701 415

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik
Program Pascasarjana Universitas Diponegoro

DR. dr. Winarto SpMK, SpM
NIP. 130 675 157

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan di dalamnya tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan lembaga pendidikan lainnya. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum/ tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Januari 2009

Joko Malis Sunarno

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Joko Malis Sunarno
NIM : G4A006008
Tempat / tanggal lahir : Banyumas, 22 April 1981
Agama : Islam
Jenis Kelamin : Laki-laki

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN 5 Samudera, Gumelar, Banyumas : 1987 - 1993
2. SMPN 1 Ajibarang, Banyumas : 1993 - 1996
3. SMUN 2 Purwokerto, Banyumas : 1996 - 1999
4. S1 Biologi UNSOED Purwokerto, Banyumas : 1999 - 2004
5. S2 Magister Ilmu Biomedik Konsentrasi Konseling
Genetika UNDIP Semarang, Jawa Tengah : 2007 - sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

1. Staf lembaga keuangan Dharmabakti Parasahabat di Sukabumi : 2004
2. Staf perusahaan otomotif Armada Mobil di Purwokerto : 2005
3. Staf Tidak Tetap Laboratorium Kesehatan Daerah di Banjarnegara : 2006

D. Pengalaman Ilmiah

1. Penelitian :
 - a. Rasio Efisiensi Pakan dan Protein Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis* Val) yang Dipuaskan secara Periodik (2004) di Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto.
2. Seminar-seminar :
 - a. *National Seminar on Medical Biotechnology and its Related Fields : Link between Pharmaceutical Industries and Research Universities* (Januari 2007) di Semarang, sebagai peserta.

- b. *Medical Genetic Course: From Basic to Clinic* (Januari 2007) di Semarang, sebagai peserta.
- c. *Symposium and workshop Early Detection on Neurodevelopmental Disorders* (September 2007) di Semarang, sebagai peserta.
- d. *The Role of Professional and Parents in Caring Children with Mental Retardation and Autism* (Mei 2008) di Semarang, sebagai peserta.

E. Riwayat Keluarga

- 1. Nama Orang Tua :
 - Ayah : Subarno
 - Ibu : Narsini
- 2. Nama Isteri : Pisesa Restu Widarani
- 3. Nama Anak : Yusuf Prima Maulana

UCAPAN TERIMA KASIH

Berkat Rahmat Allah SWT tesis yang berjudul “Distribusi Gen *Azoospermia Factor* (AZF) pada Pasien dengan Hipospadia” ini dapat diselesaikan dengan baik dan lancar. Tesis ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana S-2 di Program Pascasarjana Magister Ilmu Biomedik Universitas Diponegoro (UNDIP) Semarang. Keberhasilan dan kelancaran dalam penyusunan tesis ini juga tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak.

Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya dipersembahkan kepada kedua pembimbing yaitu dr. Tri Indah Winarni, Msi.Med dan Prof. dr. Sultana MH Faradz, PhD yang senantiasa memberikan banyak sekali saran, masukan, nasihat dan motivasi. Kemudian penulis juga berterima kasih kepada dr. Ardi Santosa, SpU dan dr. A. Zulfa Juniarto, MSi. Med, Sp.And yang telah berkenan untuk membantu dan bekerjasama dalam pengadaan sampel penelitian serta kepada Prof. Ben Hamel, PhD dari *Radboud University Nijmegen Medical Centre of Netherland* yang memberikan saran dan membantu dalam pengadaan reagent untuk PCR. Berikutnya penulis berterima kasih pula kepada segenap staf Laboratorium Unit Molekuler dan Sitogenetika Pusat Riset Biomedik / CEBIOR (*Center for Biomedical Research*) Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang yaitu: Ibu Lusi Suwarsi sebagai tenaga ahli yang membantu proses PCR dan elektroforesis, Ibu Dwi Kustiyani yang membantu menyediakan DNA untuk sampel penelitian, Ibu Wiwik Lestari yang membantu dalam administrasi serta Ibu Rita Indriyati dan Ibu Ardina Apriani yang memberikan saran dan informasi serta Bapak Taufik Ismail yang membantu mempersiapkan alat. Tidak lupa pula ucapan terima kasih diberikan kepada kedua orang tua, istri dan anak tercinta yang senantiasa memberi dukungan baik moral maupun material.

Penulis juga berterima kasih yang sebanyak-banyaknya kepada Menteri Pendidikan Nasional Republik Indonesia melalui Biro Perencanaan Kerjasama Luar Negeri yang telah memberikan bantuan beasiswa selama perkuliahan dan

kepada Dr. Soejoto SpKK(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran serta DR.dr.Winarto SpMK,SpM selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran yang telah memberikan ijin untuk menyelesaikan kuliah S2 di Universitas Diponegoro Semarang. Akhirnya ucapan terima kasih disampaikan pula kepada semua Tim Penguji yang telah mengoreksi dan melengkapi penulisan tesis ini.

Namun demikian diharapkan masih banyak lagi masukan, kritik dan saran yang sangat bermanfaat untuk penulisan lebih lanjut. Semoga tesis ini bermanfaat untuk menambah wawasan pengetahuan dan dapat dijadikan referensi untuk penelitian selanjutnya. Atas perhatiannya diucapkan terima kasih.

Semarang, Januari 2009

Joko Malis Sunarno

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
<i>ABSTRACT</i>	xiv
DAFTAR SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang Masalah	1
I.2 Perumusan Masalah	4
I.3 Tujuan Penelitian	4
I.3.1 Tujuan Umum	4
I.3.2 Tujuan Khusus	4
I.4 Manfaat Penelitian	4
I.5 Originalitas Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Identifikasi Variabel	6
II.1.1 Hipospadia dan Infertilitas	6
II.1.2 Kromosom Y	9
II.1.3 Gen AZF	11
II.2 Kerangka Teori	14
II.3 Kerangka Konsep	14

BAB III	METODE PENELITIAN	
III.1	Ruang Lingkup	15
III.2	Tempat dan Waktu	15
III.3	Jenis dan Rancangan	15
III.4	Populasi dan Sampel	15
	III.4.1 Populasi Target	15
	III.4.2 Populasi Terjangkau	16
	III.4.3 Sampel Penelitian	16
	III.4.3.1 Kriteria Inklusi	16
	III.4.3.2 Kriteria Eksklusi	16
	III.4.4 Cara Pemilihan Sampel	17
	III.4.5 Besar Sampel	17
III.5	Variabel Penelitian	18
	III.5.1 Variabel Bebas	18
	III.5.2 Variabel Terikat	18
III.6	Definisi Operasional	18
III.7	Materi dan Cara Kerja	19
	III.7.1 Ekstraksi DNA	19
	III.7.2 PCR	20
	III.7.3 Elektroforesis	22
III.8	Alur Penelitian	23
III.9	Analisis Data	24
III.10	Etika Penelitian	24
BAB IV	HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
IV.1	Hasil Penelitian	25
IV.2	Pembahasan	27
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
V.1	Kesimpulan	33
V.2	Saran	33
	DAFTAR PUSTAKA	34
	LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

Nomor		Halaman
1	Sekuen primer yang digunakan pada PCR multipleks gen AZF	21
2	Komposisi campuran PCR multipleks untuk satu reaksi	22
3	Tahapan temperatur dan waktu pada proses PCR gen AZF	22
4	Besar produk PCR region gen AZF, ZFY dan SRY yang diamati	24
5	Distribusi gen AZF pada pasien hipospadia murni	25
6	Distribusi gen AZF berdasarkan tipe hipospadia	25

DAFTAR GAMBAR

Nomor		Halaman
1	Skema tipe hipospadia menurut posisi muara uretra	7
2	Struktur genomik kromosom Y pada manusia	10
3	Hasil visualisasi produk PCR multipleks A pada gel agarosa	26
4	Hasil visualisasi produk PCR multipleks B pada gel agarosa	26

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor		Halaman
1	Daftar pasien hipospadia yang masuk dalam sampel penelitian	38
2	Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk ekstraksi DNA	39
3	Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk PCR	40
4	Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk elektroforesis	41
5	Surat persetujuan dari Tim Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang (<i>ethical clearance</i>)	42
6	Surat persetujuan setelah penjelasan dari pasien (<i>informed consent</i>)	43

ABSTRAK

Latar belakang: Penelitian terkini menemukan infertilitas pada pasien hipospadia. Jumlah sperma subnormal 6-8% pada usia dewasa dan kelainan spermatogenesis ditemukan pada pasien hipospadia dengan insufisiensi androgen. Mutasi androgen receptor juga ditemukan pada kasus infertilitas dengan oligospermia berat dan azospermia yang berkaitan dengan mutasi gen AZF pada lengan panjang kromosom Y. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui distribusi gen AZF pada pasien dengan hipospadia.

Metode: Desain penelitian adalah deskriptif non eksperimental dengan menggunakan *purposive sampling*. Sampel darah vena dengan EDTA diambil dari 31 pasien hipospadia murni yang diperiksa di Unit Molekuler dan Sitogenetika Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang, Jawa Tengah, Indonesia. DNA sample diekstraksi lalu dilakukan PCR multipleks untuk mengamplifikasi 6 sekuens dari 3 subregion gen yaitu AZFa, AZFb dan AZFc. Produk PCR dipisahkan secara elektroforesis dalam agarosa 4% dan divisualisasikan menggunakan illuminator ultraviolet.

Hasil: Tiga pasien mengalami mutasi pada subregion AZFa dan satu pasien mengalami mutasi subregion AZFb. Hasil penelitian tidak menemukan adanya mutasi subregion AZFc.

Simpulan: Ditemukan mutasi subregion AZFa 9,7% dan mutasi subregion AZFb 3,2% pada pasien hipospadia murni.

Kata kunci : hipospadia, infertilitas, gen AZF, mutasi

ABSTRACT

Background: Recently, there are many studies elucidate the aspects of infertility in patient with hypospadias. Subnormal sperm count found in 6-8% in adulthood and spermatogenesis defects were found in hypospadias cases with androgen insufficiency. Androgen receptor mutation was also found in men with severe oligospermia and azospermia which are related with AZF gene mutation in Y-chromosome's long arm. The objective of the study was to see AZF gene distribution in cases hyposapadias.

Method: Non experimental descriptive research design was used in this study with purposive sampling method. Vein bloods with EDTA were collected from 31 patients with hypospadias in Center for Biomedical Research of Medical Faculty in Diponegoro University, Semarang, Central Java, Indonesia. DNA was extracted by salting out method and was amplified by multiplex PCR technique for 6 sequences of 3 subregions AZFa, AZFb and AZFc. PCR products were separated by electrophoresis in 4% agarose gel. Visualization of genes were done by using UV illuminator.

Result: Three patients were confirmed mutation at AZFa subregion and 1 patient confirmed mutation at AZFab subregion. No mutation of AZFc subregion found in this study.

Conclusion: There were 9,7% mutations of AZFa subregion and 3,2% mutations of AZFab subregions in isolated hypospadias patients.

Keywords: hypospadias, infertility, AZF gene, mutation

DAFTAR SINGKATAN

AIS	<i>Androgen Insensitivity Syndrome</i>
AMH	<i>Anti Mullerian Hormone</i>
AZF	<i>Azoospermia Factor</i>
BPY	<i>Basic Protein on The Y Chromosome</i>
DAZ	<i>Deleted in Azoospermia</i>
DBY	<i>Dead Box Polypeptide Y</i>
DDFRY	<i>Drosophila Fat Facets-Related Y</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HSFY	<i>Heat Shock Transcription Factor, Y Chromosome</i>
IVF	<i>In Vitro Fertilization</i>
PAIS	<i>Partial Androgen Insensitivity Syndrome</i>
PCR	<i>Polymerization Chain Reaction</i>
PRY	<i>Protein kinase Y-Linked</i>
RBM	<i>RNA Binding Motif Protein</i>
RBMV	<i>RNA Binding Motif Y</i>
RNA	<i>Ribo Nucleic Acid</i>
SCOS	<i>Sertoli-Cell-Only Syndrome</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SRY	<i>Sex Determining Region Y</i>
STS	<i>Sequence Tag Site</i>
TDF	<i>Testis Determining Factor</i>
TDS	<i>Testicular Dysgenesis Syndrome</i>
TSPY	<i>Testis Specific Protein</i>
UTY	<i>Ubiquitously Transcribed TPR Gene on Y Chromosome</i>
ZFX	<i>Zinc Finger Protein X</i>
ZFY	<i>Zinc Finger Protein Y</i>

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Hipospadia merupakan anomali kongenital yang ditinjau dari posisi anatomisnya tampak berupa pembukaan saluran uretra di bagian ventral penis maupun anterior penis di sepanjang *raphe phenoscrotal*. Bentuk penis biasanya melengkung yang dikenal sebagai *chordee/ ventral curvature* dan ukurannya lebih pendek daripada laki-laki normal. *Chordee* terbentuk karena adanya perbedaan perkembangan antara jaringan dorsal yang normal dengan jaringan ventral yang terhambat sehingga penis melengkung ke bawah. Deformitas tersebut apabila tidak dikoreksi dapat mengakibatkan kegagalan sperma masuk ke dalam vagina pada saat ejakulasi sehingga fertilisasi tidak dapat terjadi.¹

Prevalensi hipospadia secara umum sangat bervariasi dari 0.37 sampai 41/10000 bayi. Kejadian hipospadia telah dilaporkan di beberapa negara seperti Inggris dan Wales, Swedia, Norwegia, Denmark, Finlandia, Spanyol, New Zealand, Australia dan Cekoslovakia. Penelitian di Amerika melaporkan kejadian yang lebih tinggi pada kulit putih daripada kulit hitam sedangkan di Finlandia kejadiannya lebih rendah yaitu 5/10.000 dibandingkan dengan negara-negara Skandinavia lainnya yaitu 14/10.000 bayi.² Kasus hipospadia juga telah banyak ditemukan di Indonesia.

Hipospadia merupakan salah satu aspek dalam sindroma *Testicular Dysgenesis Syndrome* (TDS). Aspek lain dalam sindroma ini adalah cryptorchidism yaitu kelainan posisi testis yang tidak berada di dalam skrotum karena adanya kegagalan proses penurunan pada tahap transabdominal dan inguinal. Cryptorchidism merupakan kelainan yang sangat umum berkaitan dengan hipospadia karena memiliki latar belakang penyebab yang sama yaitu paparan estrogen ataupun bahan antiandrogenik selama dalam kandungan yang berpengaruh terhadap fertilitasnya.^{1,3} Kelainan fungsi androgen pada perkembangan sistem reproduksi juga berakibat pada terjadinya hipospadia ataupun cryptorchidism.⁴

Infertilitas merupakan masalah serius yang sering dialami oleh pasangan suami istri. Ditinjau dari prevalensi menurut *American Society for Reproductive Medicine*, 14% pasangan di Amerika diketahui menderita infertilitas dimana 30% sampai 40% kasus dipengaruhi oleh faktor laki-laki, sedangkan 20% kasus mutlak karena faktor laki-laki. Penyebab-penyebab infertilitas dari faktor laki-laki antara lain oligospermia (kurangnya produksi sperma) dan azospermia (tidak dapat memproduksi sperma sama sekali) yang diketahui berkorelasi dengan faktor genetik dan anomali kongenital.⁵ Oligospermia idiopatik merupakan kasus sedikitnya jumlah sperma tanpa diketahui secara pasti penyebabnya. Kasus ini paling sering ditemukan sebagai penyebab infertilitas. Beberapa kondisi fisik yang dapat mengakibatkan infertilitas pada laki-laki adalah hipospadia, cryptorchidism dan varicocele.⁶

Kasus infertilitas pada laki-laki secara molekuler berkaitan dengan adanya delesi gen yang lokusnya terletak pada kromosom Y lengan panjang (Yq) yang dikenal sebagai gen AZF (*Azoospermia Factor*). Penelitian terdahulu telah membuktikan adanya korelasi positif antara kasus mutasi gen AZF dengan infertilitas. Gen AZF mensintesis protein untuk mengatur proses perkembangan sistem reproduksi khususnya dalam perkembangan gonad sehingga delesi pada gen ini dapat berakibat pada azoospermia maupun oligospermia. Gen ini memiliki tiga subregion yaitu AZFa, AZFb dan AZFc yang masing-masing mutasinya berpengaruh terhadap kegagalan produksi sperma.⁷ Mutasi gen AZF juga telah ditemukan peneliti sebelumnya pada kasus cryptorchidism⁸ dan varicocele.⁹

Korelasi terbalik antara angka fertilitas dengan meningkatnya kejadian hipospadia juga telah dilaporkan.⁷ Mekanisme perkembangan kelamin eksternal didukung oleh konversi hormon testosteron, androgen reseptor dan sel-sel Leydig pada testis dimana gen AZF terkespresi pada testis.¹⁰ Studi di Jepang telah meneliti kemungkinan adanya mikrodelesi gen AZF pada region interval 6 atau AZFc untuk pasien hipospadia murni.¹⁰ Penelitian lain menemukan adanya mutasi reseptor androgen pada laki-laki dengan oligospermia berat dan azoospermia¹¹ serta pasien delesi region AZFc.¹² Fakta lain menemukan bahwa gen DBY juga terekspresi pada sel-sel somatik testis¹³ yang meliputi sel-sel Leydig. Penemuan-penemuan tersebut melatarbelakangi dilakukannya penelitian untuk mengetahui distribusi gen AZF pada pasien hipospadia.

I.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas maka permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut: bagaimanakah distribusi gen AZF pada pasien dengan hipospadia ?

I.3 Tujuan Penelitian

I.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian adalah untuk mengetahui distribusi gen AZF pada pasien dengan hipospadia.

I.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian antara lain mengetahui distribusi subregion gen AZFa, AZFb, AZFc pada pasien hipospadia murni.

I.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari hasil penelitian antara lain untuk menambah wawasan ilmiah di bidang genetika kedokteran, untuk mengetahui distribusi gen AZF pada pasien dengan hipospadia murni dan untuk bahan pertimbangan dalam konseling untuk pengelolaan pasien serta sebagai dasar untuk melakukan penelitian berikutnya yang berkaitan.

I.5 Originalitas Penelitian

No	Judul, Pengarang, Jurnal	Metode Penelitian	Hasil
1	Tateno <i>et al.</i> 2000. ¹⁰	Sampel DNA (<i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>) diekstraksi dari limfosit peripheral 44 pasien hipospadia murni dengan kariotipe 46,XY yang rata-rata berusia 9 tahun dengan variasi karakteristik 6 subcoronal, 16 penile, 17 penoscrotal dan 5 scrotal. PCR dilakukan dengan menggunakan 33 primer. DNA perempuan dan laki-laki normal digunakan sebagai kontrol internal.	Hasil menunjukkan tidak ada delesi pada 33 lokus DNA yang diamplifikasi, termasuk gen DAZ (<i>Deleted in Azoospermia</i>), RBM (<i>RNA Binding Motif</i>) dan SRY (<i>Sex Determining Region Y</i>). Empat pasien hipospadia yang berusia lebih dari 20 tahun memiliki semen yang normal.
2	Giachini <i>et al.</i> 2007. ⁸	Sebanyak 146 pasien dengan cryptorchidism dan 140 pasien infertil non-cryptorchid dilakukan skrining dengan metode STS plus/minus dan dikonfirmasi dengan deteksi gen CDY1 /DAZ yang ada pada region AZFc.	Frekuensi delesi 4,2% pada cryptorchid dan 5% pada non cryptorchid dengan hasil analisis tidak berbeda. Perbedaan muncul apabila pasien cryptorchid dibandingkan dengan kontrol normospermik.

Penelitian sebelumnya mendeteksi gen AZF khusus pada subregion AZFc¹⁰ sedangkan penelitian ini mendeteksi ketiga subregion AZF. Kemudian penelitian lain mendeteksi gen AZF pada obyek penelitian pasien dengan cryptorchidism⁸ sedangkan penelitian ini menggunakan obyek penelitian pasien hipospadia tanpa cryptorchidism.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

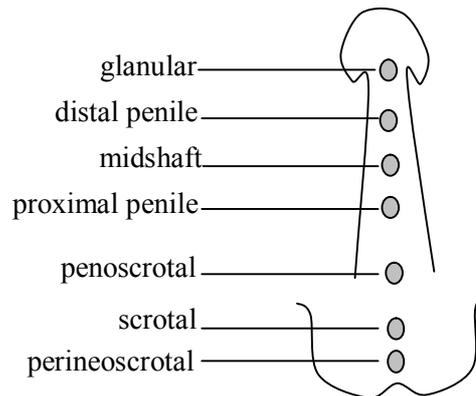
II.1 Identifikasi Variabel

II.1.1 Hipospadia dan Infertilitas

Hipospadia didefinisikan sebagai kelainan pada perkembangan uretra, kulit luar dan aspek ventral dari penis pada saat proses perkembangan fetus yang mengakibatkan disposisi muara uretra di sepanjang anterior sampai posterior dari penis.¹⁴ Klasifikasi hipospadia menurut posisi muara terbagi menjadi anterior/ distal (glandular, coronal, subcoronal), middle (midpenile) dan posterior/ proximal (posterior penile, penoscrotal, scrotal, perineal).¹ Peneliti lain membagi tipe hipospadia menjadi: *glanular, distal penile, midshaft, proximal penile, penoscrotal, scrotal* dan *perineoscrotal* (Gambar 1).¹⁵ Kisaran proporsi masing-masing tipe yang secara umum ditemukan adalah 60-65% distal, 20-30% midpenile dan 10-15% proximal. Insidensi hipospadia, kanker testis dan cryptorchidism secara umum meningkat dengan kualitas semen yang menurun.¹⁴

Gen SRY pada laki-laki berperan mengatur perkembangan krista gonadalis menjadi testis yang kemudian menghasilkan testosteron. Testosteron dapat diderivasi menjadi metabolit aktif dihidrotestosteron dengan bantuan enzim katalisis 5α -reduktase. Testosteron mengatur

perkembangan duktus wolffian untuk berdiferensiasi menjadi organ kelamin internal sedangkan dihidrotestosteron mengatur diferensiasi dan stabilisasi sinus urogenital menjadi organ kelamin eksternal.¹



Gambar 1. Skema tipe hipospadia menurut posisi muara uretra.¹⁵

Patogenesis hipospadia terjadi pada proses perkembangan uretra yaitu minggu ke 8-20 dalam kandungan¹ Diferensiasi seksual ke arah fenotip laki-laki terjadi setelah usia embrio 6 minggu.¹⁶ Kemudian setelah usia 12 minggu dalam kandungan akan terlihat adanya kelainan proses fusi pada lipatan uretra dalam perkembangannya.¹⁷ Kelainan dalam proses fusi ini dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu genetik, hormonal dan lingkungan.¹⁷

Peningkatan insidensi hipospadia terjadi pada bayi yang lahir secara prematur dengan berat badan rendah. Selain itu adanya paparan yang berlebih dari progestin, senyawa yang mengandung estrogen seperti pestisida, susu sapi, beberapa tanaman dan obat-obatan ataupun aktifitas anti-androgenik yang dikonsumsi ibu pada saat bayi dalam kandungan juga meningkatkan kejadian hipospadia.¹

Fenotip laki-laki tergantung pada keberadaan atau sensitifitas terhadap androgen yang bergantung juga pada diferensiasi testis.¹⁸ Beberapa sindroma yang disertai dengan hipospadia di antaranya adalah *Reifenstein syndrome*¹⁸, *Opitz syndrome*, *Klinefelter syndrome*, *Edward syndrome*, *Patau syndrome*.¹⁷ Sebagian besar kasus hipospadia disebabkan oleh multifaktorial dan beberapa kasus ditemukan sebagai hasil mutasi gen tunggal ataupun gangguan ekspresi gen.¹⁹ Penelitian lain menemukan bahwa dari segi familial, ayah dari 7% pasien dengan hipospadia diketahui menderita hipospadia dan saudara dari 14% pasien diketahui menderita hipospadia serta pola penurunannya cenderung bersifat poligenik.²⁰

Peneliti sebelumnya menyatakan bahwa criptorchidism dan hipospadia adalah dua malformasi kongenital yang umum terjadi pada anak-anak, dan pada stadium dewasa memiliki jumlah sperma yang subnormal.²¹ Kemudian peneliti lain mengatakan bahwa kualitas semen yang buruk, kanker testis, *undescended testis* dan hipospadia adalah gejala yang mendasari adanya peningkatan kejadian TDS.⁴ Infertilitas pada laki-laki merupakan kelainan yang dapat disebabkan oleh kesalahan dalam proses spermatogenesis yang melibatkan dua proses yaitu pembelahan sel dan diferensiasi sel germinal. Selain itu beberapa kasus infertilitas dapat disebabkan karena faktor genetik.²² Mutasi pada gen-gen fungsional pada sel germinal laki-laki dikenal secara umum sebagai penyebab infertilitas.²³

Infertilitas pada laki-laki yang bersifat idiopatik telah diketahui berasal dari faktor genetik seperti kelainan kromosomal, kelainan

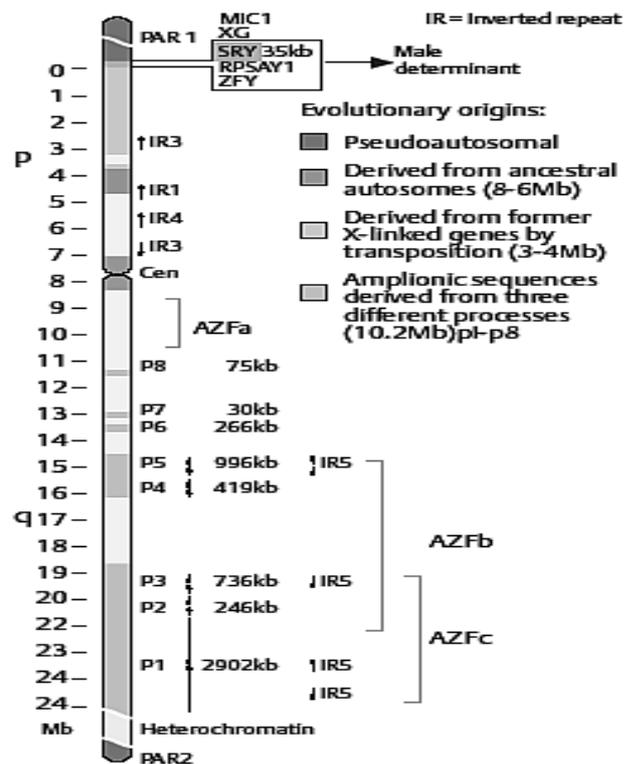
monogenik, kelainan multifaktorial dan kelainan hormonal. Salah satu penyebab infertilitas pada laki-laki yang sering diteliti adalah mikrodelesi gen AZF pada kromosom Y lengan panjang yang diketahui berperan dalam fertilitas khususnya proses spermatogenesis. Mutasi ataupun delesi pada gen ini dapat menyebabkan infertilitas pada laki-laki karena terjadi kerusakan spermatogenik yang berakibat menjadi azoospermia atau oligospermia.²⁴

II.1.2 Kromosom Y

Semua manusia normal memiliki sepasang kromosom kelamin pada setiap selnya. Pada laki-laki kromosom kelaminnya adalah X dan Y sedangkan pada perempuan adalah dua kromosom X. Kromosom Y sebagai salah satu kromosom penentu kelamin pada manusia mengandung sekitar 60 megabasa dan jumlah tersebut adalah 0,38% dari total DNA dalam satu sel dan membawa gen fungsional yang jumlahnya sangat sedikit.²⁵ Pada gambar 2 tampak pada lengan panjang kromosom Y terdapat tiga subregion gen AZF yaitu AZFa pada bagian proksimal, AZFb dan AZFc pada bagian distal yang tampak saling overlap.²⁶

Skrining mikrodelesi kromosom Y digunakan sebagai alat diagnostik yang sangat bermanfaat untuk mengidentifikasi pasien dan memberikan informasi akurat dalam manajemen klinis pada laki-laki infertil dan masa depan anak laki-lakinya.²⁷ Frekuensi oligospermia berat dan azoospermia idiopatik tergantung pada delesi region pada kromosom Y yang mengontrol spermatogenesis.²⁸ Skrining mikrodelesi pada kromosom Y menjadi

kegiatan yang rutin dan telah terjadi peningkatan permintaan untuk tes kromosom ini.²⁹



Gambar 2. Struktur genomik kromosom Y pada manusia.²⁶

Saat ini metode skrining mikrolelesi pada kromosom Y sudah menggunakan standar internasional. Standar tersebut merekomendasikan penggunaan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) multipleks untuk diagnosis mikrolelesi kromosom Y dengan menyertakan gen ZFX (*Zinc Finger Protein X*) / ZFY (*Zinc Finger Protein Y*) sebagai kontrol internal.³⁰ Selain itu digunakan juga DNA laki-laki dan perempuan normal untuk kontrol negatifnya dimana semua kontrol ini harus ada pada setiap running PCR multipleks.³⁰

II.1.3 Gen AZF

AZF adalah gen yang terletak pada kromosom Y di bagian eukromatin lengan panjang region 1 band 1 (Yq11). Nama AZF ditentukan oleh HUGO (*Human Genome Organisation Gene Nomenclature Committee*). Ada tiga subregion gen AZF yang telah dipetakan yaitu AZFa, AZFb, dan AZFc, pada lengan panjang kromosom Y bagian proksimal dan distal yang berasosiasi dengan infertilitas pada laki-laki.^{7,33} Delesi pada masing-masing region ini secara umum akan menyebabkan kegagalan produksi sperma baik oligospermia maupun azoospermia.³¹

Subregion AZFa terletak pada bagian proksimal dari lengan panjang kromosom Y dan terdiri atas gen-gen antara lain UTY (*Ubiquitously Transcribed TPR Gene on Y Chromosome*) yang terekspresi pada jaringan ubiquitus³¹, DFFRY (*Drosophila Fat Facets-Related Y*) dan DBY (*Dead Box Polypeptide Y*)³ yang terekspresi pada tiga jaringan yaitu otak, prostat dan testis³² yang bertanggung jawab pada proses spermatogenesis.³³ Ukuran total subregion AZFa adalah 800kb.³⁴ Sedangkan subregion AZFb terletak di bagian distal dan memiliki beberapa gen yaitu RBMY yang terekspresi pada testis³³ khususnya berperan dalam perkembangan sel-sel germinal³⁵, gen PRY (*Protein kinase Y-Linked*) yaitu PRY1 dan PRY2 yang bertanggung jawab pada proses spermatogenesis³⁶ dan HSFY (*Heat Shock Transcription Factor, Y Chromosome*) yang delesinya menyebabkan infertilitas berat pada laki-laki.³⁷ Ukuran total subregion AZFb adalah 3,2Mb.³⁷ Kemudian subregion AZFc terletak pada bagian paling distal dan

terdiri dari gen DAZ yang terekspresi pada sel-sel germinal dan diduga sebagai titik kontrol metabolisme RNA (*Ribo Nucleic Acid*) dalam proses spermatogenesis.²² Ukuran total subregion AZFc adalah 3,5Mb.³⁸

Secara spesifik telah diteliti bahwa pada region AZFa, gen DFFRY lebih banyak terekspresi pada sel-sel germinal pada testis sedangkan gen DBY lebih banyak terkespresi pada sel-sel somatiknya.¹³ Kemudian delesi pada region AZFb telah diketahui berasosiasi dengan penghambatan perkembangan dari sel-sel pada stadium pachytene dan mengakibatkan penghambatan pada pematangan proses meiosis.³⁹ Sedangkan delesi pada region AZFc berkaitan dengan penghambatan perkembangan sel-sel germinal pada stadium spermatid, namun ditemukan juga berasosiasi dengan pematangan sperma yang terhambat serta jumlah sperma yang rendah.³⁹ Penemuan-penemuan tersebut menunjukkan bahwa masing-masing region gen AZF memberikan karakteristik fenotipe yang berbeda-beda dan gen-gen pada tiap lokus pun terekspresi pada stadium yang berbeda dalam proses perkembangan sel-sel germinal.

Delesi pada AZFa dan AZFb proksimal merupakan penyebab kecacatan berat pada proses spermatogenesis dan merupakan faktor penyebab SCOS (*Sertoli Cells Only Syndrome*) yaitu hilangnya sel-sel germinal pada jaringan testis^{23,34} atau disebut juga *germinal cell aplasia*⁴⁰ dan merupakan penyebab utama azoospermia.³ Penelitian lain juga menyimpulkan bahwa AZFb terekspresi pada testis manusia.³³ Penelitian lain menemukan bahwa mikrodelesi pada AZFa atau AZFb menandakan

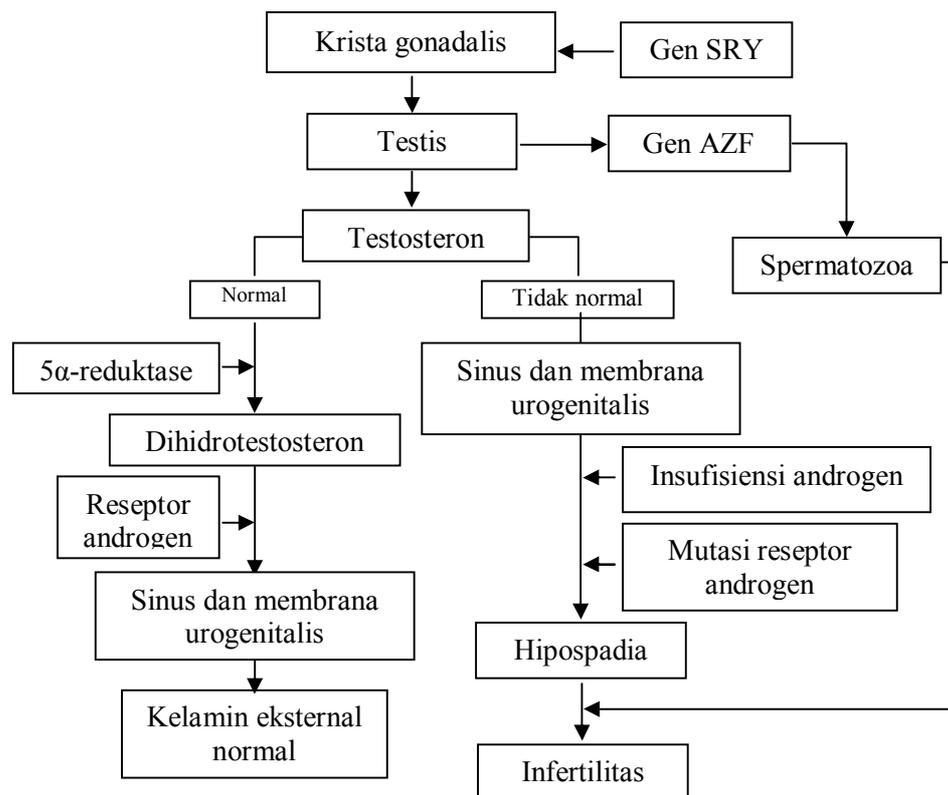
adanya prognosis yang buruk pada perbaikan sperma.⁴¹ Laki-laki dengan delesi gen AZFb juga akan mengalami penghambatan pada proses meiosis. Sedangkan delesi pada sebagian gen AZFb yang distal menyebabkan produksi sperma yang sedikit (oligospermia).³¹ Kemudian mikrodeselesi AZFc berkaitan dengan azospermia atau oligospermia dengan penurunan jumlah sperma secara progresif⁴² namun mayoritas laki-laki yang mengalami mikrodeselesi pada AZFc memiliki sperma dalam semen atau testis yang dapat digunakan untuk IVF (*In Vitro Fertilization*).⁴¹ Oleh karena itu pada beberapa kasus delesi gen AZFc ditemukan adanya pewarisan sifat pada anak laki-lakinya.²³

Mikrodeselesi pada region gen AZF diketahui berkaitan erat dengan adanya mutasi pada reseptor androgen. Hal ini didasarkan pada penelitian sebelumnya yang menemukan adanya pengulangan trinukleotida CAG (*cytosine-adenine-guanosine*) pada exon 1 yang lebih banyak di reseptor androgen pada penderita oligospermia berat dan azospermia. Rata-rata jumlah pengulangan CAG pada laki-laki yang infertil berbeda nyata dengan laki-laki yang fertil.¹¹ Mutasi gen reseptor androgen juga ditemukan oleh peneliti lain pada laki-laki infertil yang mengalami delesi AZFc.¹²

Selain tiga subregion yang dikenal secara umum, ada juga yang dalam penelitiannya menduga adanya subregion tambahan yaitu AZFd yang terletak di antara subregion AZFb dan AZFc yang mutasinya menyebabkan *mild* oligospermia atau bahkan jumlah sperma yang normal namun morfologinya abnormal.⁴³ Frekuensi dari abnormalitas kariotip,

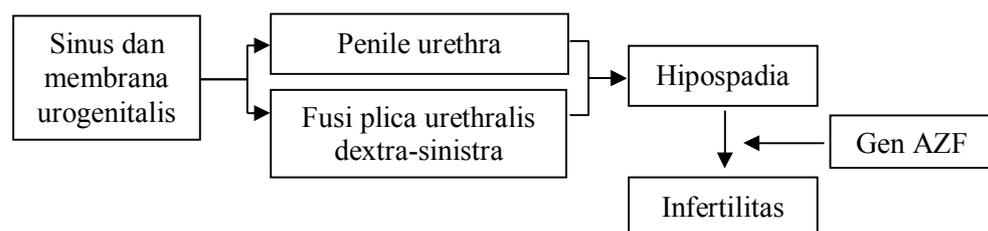
penyimpangan sinapsis miotik dan delesi gen AZF pada laki-laki infertil mendasari pentingnya tes genetik dan konseling ketika pasien tersebut diarahkan untuk menjalani reproduksi terbantu.⁴⁴

II.2 Kerangka Teori



II.3 Kerangka Konsep

Penemuan adanya infertilitas pada pasien hipospadia mendorong dilakukannya penelitian untuk mendeteksi mutasi gen AZF pada kasus hipospadia.



BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Ruang Lingkup Penelitian

Ruang lingkup penelitian ini adalah di bidang genetika molekuler dalam ilmu kedokteran.

III.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Unit Molekuler dan Sitogenetika Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang pada tahun 2008 s.d 2009.

III.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian adalah deskriptif non eksperimental dengan pendekatan *cross sectional* bertujuan untuk mencari data awal dari distribusi gen AZF pada pasien dengan hipospadia.

III.4 Populasi dan Sampel

III.4.1 Populasi Target

Populasi target penelitian adalah semua pasien hipospadia murni.

III.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi yang terjangkau adalah pasien hipospadia murni yang diperiksa di Unit Molekuler dan Sitogenetika Pusat Riset Biomedik Fakultas Kedokteran UNDIP Semarang.

III.4.3 Sampel Penelitian

III.4.3.1 Kriteria Inklusi

- Kondisi klinis pasien adalah hipospadia murni.
- Pasien diperiksa di laboratorium sejak tahun 2005 sampai 2007 hasil analisis kromosom menunjukkan kariotipe pasien 46,XY (analisis sitogenetik dilakukan oleh peneliti sebelumnya)
- Pasien bersedia diambil sampel darahnya.

III.4.3.2 Kriteria Eksklusi

- Pasien hipospadia disertai dengan kelainan kromosomal.
- Pasien hipospadia disertai sindroma AIS (*Androgen Insensitivity Syndrome*) maupun PAIS (*Partially AIS*).
- Pasien hipospadia disertai dengan anomali kongenital lainnya.
- Pasien menolak dalam proses pengambilan sampel darah.

III.4.4 Cara Pemilihan Sampel

Pengambilan sampel penelitian menggunakan metode *purposive sampling* dengan cara memilih pasien hipospadia yang murni tanpa disertai manifestasi klinik lain. Kemudian karena jumlah pasien hipospadia murni sangat banyak maka diambil sampel sesuai dengan besar sampel minimal secara acak sederhana.

III.4.5 Besar Sampel

Jumlah sampel minimal yang harus diambil dalam penelitian ini ditentukan dengan rumus besar sampel tunggal⁴⁴ yaitu sebagai berikut:

$$N = \frac{z\alpha^2(PQ)}{d^2} = \frac{(1,96)^2 \times 0,25}{(0,2)^2}$$

Keterangan : $z\alpha$ = tingkat kemaknaan

P = Proporsi kejadian mutasi gen AZF pada kasus hipospadia murni (karena belum diketahui maka menggunakan nilai P X Q yang tertinggi yaitu dengan P : 0,5)

Q = 1-P

d = ketepatan absolut

Mengingat adanya kemungkinan sampel rusak atau kegagalan pada proses pengerjaan sampel (*drop out*) sekitar 20% maka perlu ada koreksi jumlah sampel minimal setelah memperhitungkan adanya sampel yang *drop out* (do) sehingga jumlah sampel minimalnya (N_{do}) menjadi:

$$N_{do} = \frac{N}{(1-do)} = \frac{24}{(1 - 0,2)} = 30 \text{ sampel}$$

Penelitian ini mengambil sampel sejumlah 31 pasien hipospadia murni dengan daftar pasien terlampir (Lampiran 1).

III.5 Variabel Penelitian

III.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang diamati adalah pasien hipospadia murni.

III.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat yang diamati adalah mutasi region gen AZF yang terdiri dari tiga subregion yaitu AZFa, AZFb dan AZFc.

III.6 Definisi Operasional

No	Variabel	Skala
1	Hipospadia murni, ditentukan dengan pemeriksaan secara fisik dengan ditemukannya kelainan posisi muara uretra yang tidak normal yaitu terdapat pada sepanjang penis dan tidak ditemukannya kelainan fisik kelamin lain yaitu cryptorchidism serta pemeriksaan kromosomal untuk mengetahui kariotipnya normal tanpa kelainan jumlah maupun struktur kromosom.	Ordinal
2	Mutasi region gen AZFa, diketahui dengan tidak munculnya pita gen berukuran 320bp dan atau 326bp pada gel agarosa.	Ordinal
3	Mutasi region gen AZFb, diketahui dengan tidak munculnya pita gen berukuran 274bp dan atau 301bp pada gel agarosa.	Ordinal
4	Mutasi region gen AZFc, diketahui dengan tidak munculnya pita gen berukuran 400bp dan atau 126bp pada gel agarosa.	Ordinal

III.7 Materi dan Cara Kerja

III.7.1 Ekstraksi DNA

Materi yang digunakan antara lain: sampel darah vena dari pasien dengan hipospadia, buffer lisis pH 7,5, buffer TE kuat pH 7,5 (Tris 20mM dan EDTA 5mM) dan buffer TE normal (Tris 10mM dan EDTA 1mM), garam NaCl 6M, enzim proteinase K 10mg/ml, SDS 10%, ethanol absolut, alkohol 70% dan EDTA 0,5M. Alat yang digunakan adalah spuit ukuran 10ml, tabung vakum berisi EDTA ukuran 10ml, tabung plastik ukuran 50ml, sentrifuse, pipet, waterbath, tabung ukuran 15ml dan tabung eppendorf ukuran 1,5ml. Daftar lengkap spesifikasi bahan dan alat yang digunakan untuk ekstraksi DNA dapat dilihat pada lampiran 2.

Darah vena diambil secara steril dengan spuit ukuran 10ml sebanyak kurang lebih 5ml dari pasien. Darah tersebut dipindahkan ke dalam tabung EDTA supaya tidak menggumpal dalam periode waktu yang lama. Proses ekstraksi DNA menggunakan metode *salting out* dengan prinsip kerja lisis sel limfosit dan pemisahan/ pemurnian DNA dari garam. Proses dimulai dengan menuangkan darah dari tabung EDTA ke dalam tabung 50ml ditambahkan buffer lisis hingga volume 50ml. Campuran disentrifuse 3500rpm selama 10menit untuk memisahkan pelet dengan supernatannya. Proses pelarutan diulang sampai supernatan jernih lalu supernatan dibuang

untuk mendapatkan pelet yang berwarna putih. Pada pelet ditambahkan 100ul SDS, 2ml buffer TE kuat dan 50ul enzim proteinase K lalu dicampur hingga sempurna kemudian disimpan dalam waterbath pada suhu 50°C selama 18jam. Setelah itu ditambahkan NaCl sepertiga volume campuran lalu dikocok kemudian disentrifuse pada 4000rpm selama 10menit. Supernatan dimasukkan ke dalam tabung 15ml ditambah ethanol absolut dua kali volume supernatan lalu dibolak-balik perlahan sehingga terkumpul DNA seperti kabut putih. DNA diambil dengan jarum spuit lalu dicuci dengan alkohol dan dimasukkan ke tabung eppendorf 1,5ml dan dibiarkan sampai alkohol menguap semua. Setelah itu DNA dilarutkan dengan 500ul buffer TE normal lalu tabung ditutup dan ditunggu sampai benar-benar larut baru kemudian siap untuk dilakukan PCR.

III.7.2 PCR

Materi yang digunakan antara lain : DNA hasil ekstraksi, enzim Ampli Taq (*Thermus Aquaticus*) DNA polymerase, PCR Buffer 10X + MgCl₂ (15mM), dNTPs (8,33mM) yang terdiri atas dATP, dTTP, dGTP dan dCTP, mQ (aquabides) dan primer. Primer yang digunakan adalah primer untuk gen AZF, SRY dan ZFY. Primer untuk gen AZF terdiri dari 6 sekuens yaitu sY86 dan sY86 untuk AZFa, sY127 dan sY134 untuk AZFb, sY254 dan sY255 untuk AZFc yang masing-masing di PCR dengan teknik multipleks.⁴⁶ PCR multipleks dibagi dua kelompok multipleks A dan B untuk memisahkan sekuen-sekuen yang memiliki perbedaan besar produk

yang kecil untuk memudahkan dalam pembacaan (Tabel 1). Gen SRY dan ZFY disertakan pada masing-masing multipleks tersebut sebagai kontrol internal.^{46,47} Alat yang digunakan adalah mikropipet dengan ukuran sesuai kebutuhan, tabung eppendorf ukuran 0,5ml, vortex dan mesin PCR. Daftar lengkap spesifikasi bahan dan alat yang digunakan untuk PCR ada pada lampiran 3.

Tabel 1. Sekuen primer yang digunakan pada PCR multipleks gen AZF.⁴⁶
F artinya *Forward* dan R artinya *Reverse*.

Multipleks	Gen/lokus	Primer
A dan B	ZFY	F:5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3' R:5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'
A dan B	SRY	F:5'- GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3' R:5'- GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'
A	sY86	F:5'- GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3' R:5'- ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'
A	sY127	F:5'- GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3' R:5'- CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'
A	sY254	F:5'- GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3' R:5'- GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'
B	sY84	F:5'- AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3' R:5'- GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'
B	sY134	F:5'- GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3' R:5'- ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'
B	sY255	F:5'- GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3' R:5'- CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'

Komposisi campuran reaksi untuk PCR disajikan pada tabel 2. Selain DNA sampel ada DNA laki-laki normal digunakan sebagai kontrol eksternal positif untuk mengontrol sensitifitas dan spesifisitas proses PCR, DNA perempuan normal digunakan sebagai kontrol eksternal negatif untuk mengontrol spesifisitas dan kontaminasi, dan air (aquabidest) digunakan sebagai blangko sampel untuk mengontrol kontaminasi pada reagen yang digunakan.⁴⁷ Masing-masing *amplification mix* dimasukkan ke dalam

tabung eppendorf ukuran 0,5ml untuk dilakukan amplifikasi dengan mesin PCR. Profil PCR yang digunakan untuk amplifikasi gen AZF disajikan pada Tabel 3.

Tabel 2. Komposisi campuran PCR multipleks untuk satu reaksi.

Bahan	Volume (ul)
PCR Buffer + MgCl ₂	5,0
dNTP's (8,33mM)	1,0
Ampli Taq Gold	0,2
Primer multipleks A atau B	5,0
mQ (aquabidest)	7,8
DNA	1,0
Volume total	20,0

Tabel 3. Tahapan temperatur dan waktu pada proses PCR gen AZF.

Tahap	Temperatur (°C)	Periode (menit:detik)
Inisiasi/ denaturasi awal	94,0	03:00
Denaturasi	94,0	00:30
Annealing	55,0	00:45
Elongasi	72,0	00:45
Elongasi akhir	72,0	07:00
Stabilisasi	10,0	∞
Siklus	35 kali	

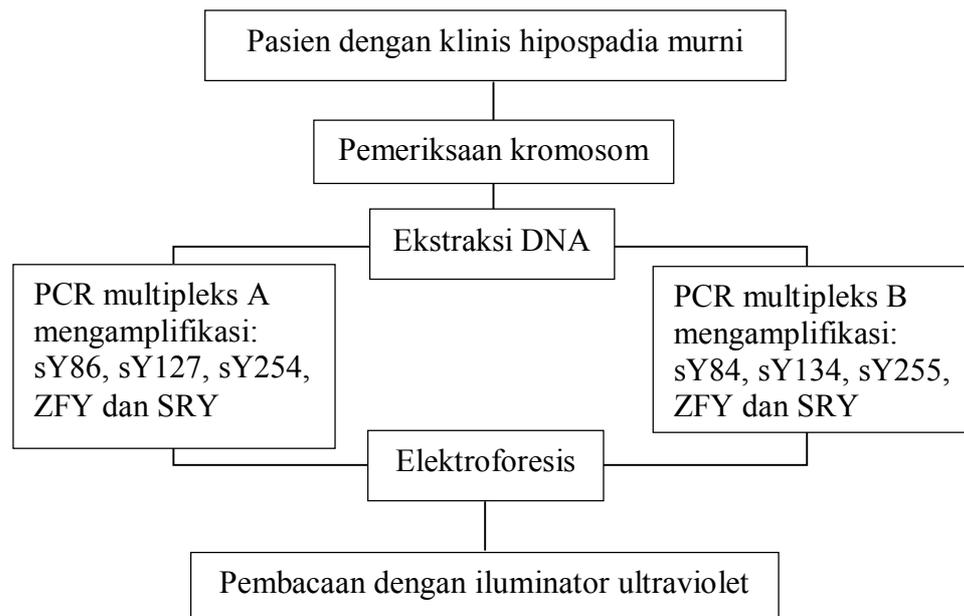
III.7.3 Elektroforesis

Materi yang digunakan antara lain produk PCR, buffer TBE 0,5X, aquabidest, agarosa, etidium bromida, loading buffer tipe I dan 100bp *Ladder DNA Marker*. Gel elektroforesis dibuat dengan agarosa 4% dalam buffer TBE 0,5X dan diberi 10ul etidium bromida sebagai pewarna DNA. Alat yang digunakan untuk elektroforesis adalah mikropipet dengan ukuran sesuai kebutuhan, tangki elektroforesis, pencetak agarosa, *hot magnetic*

stirer dan mesin elektroforesis. Daftar lengkap spesifikasi alat dan bahan yang digunakan untuk elektroforesis terdapat pada lampiran 4.

Produk PCR sebanyak 7ul dicampur dengan loading buffer sebanyak 3ul kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel yang sudah terendam buffer TBE 0,5X dan diberi pewarna etidium bromida 10ul dalam tangki elektroforesis secara hati-hati jangan sampai mengkontaminasi sumur lainnya. Marker ditempatkan pada sumur sendiri untuk mengukur besar produk yang akan muncul. Tangki ditutup rapat kemudian dihubungkan dengan mesin elektroforesis. Mesin elektroforesis dijalankan pada tegangan 100V selama \pm 2jam. Gen-gen yang sudah terpisah dapat divisualisasikan dengan bantuan sinar ultraviolet yang ukurannya bisa ditentukan dengan menggunakan pita-pita pada kolom marker.

III.8 Alur Penelitian



III.9 Analisis Data

Hasil penelitian dikatakan valid dengan syarat-syarat: pada kolom marker muncul semua pita, pada kolom blangko tidak muncul pita, pada kolom kontrol laki-laki normal muncul semua gen yang diamplifikasi dan pada kolom kontrol perempuan normal muncul pita untuk gen ZFY. Ukuran besar produk masing-masing gen dalam satuan bp (*base pair*) ditampilkan pada tabel 4 berikut:

Tabel 4. Besar produk PCR region gen AZF, ZFY dan SRY yang diamati.

Multipleks A		Multipleks B	
Gen	Besar produk	Gen	Besar produk
AZFa (sY86)	320 bp	AZFa (sY84)	326 bp
AZFb (sY127)	274 bp	AZFb (sY134)	301 bp
AZFc (sY254)	400 bp	AZFc (sY255)	126 bp
ZFY	495 bp	ZFY	495 bp
SRY	472 bp	SRY	472 bp

III.10 Etika Penelitian

Penelitian ini telah memperoleh persetujuan dari Tim Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang dalam bentuk *ethical clearance* (Lampiran 5). Persetujuan dari pasien diperoleh setelah diberikan penjelasan-penjelasan mengenai hak-haknya serta manfaat yang didapatkan dari hasil penelitian untuk kemudian menyatakan bersedia ikut serta dengan menandatangani *informed consent* (Lampiran 6).

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Hasil penelitian pada 31 pasien hipospadia murni yang diperiksa, ditemukan 4 pasien yang mengalami mutasi. Tiga pasien mengalami mutasi subregion AZFa dengan proporsi 9,7% dan 1 pasien mengalami mutasi subregion AZFab dengan proporsi 3,2%. Distribusi gen AZF secara keseluruhan dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Distribusi gen AZF pada pasien hipospadia murni.

Tanda positif (+) menunjukkan presensi sekuen/ gen dan tanda negatif (-) menunjukkan absensi/ mutasi sekuen/ gen.

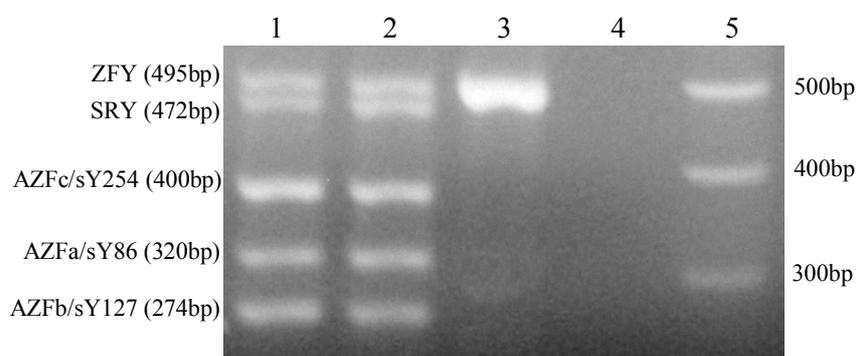
Hasil	Jml	AZFa	AZFb	AZFc	ZFY	SRY
		sY86/sY84	sY127/sY134	sY254/sY255		
Normal	27	+ / +	+ / +	+ / +	+	+
Mutasi AZFa	3	+ / -	+ / +	+ / +	+	+
Mutasi AZFab	1	+ / -	+ / -	+ / +	+	+
Total	31					

Distribusi mutasi gen AZF ditinjau dari tipe hipospadia ditemukan mutasi AZFa dan AZFab pada tipe penile (Tabel 6).

Tabel 6. Distribusi gen AZF berdasarkan tipe hipospadia.

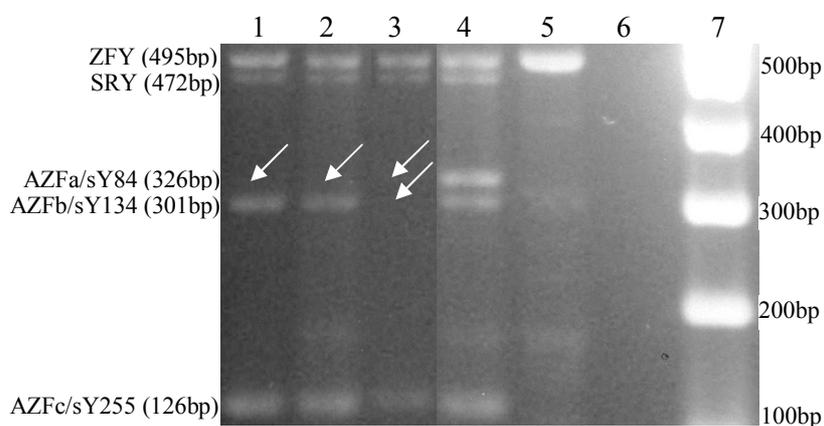
Tipe hipospadia	Jumlah populasi	Mutasi		
		AZFa	AZFb	AZFc
Coronal	2	-	-	-
Penile	24	4	1	-
Penoscrotal	2	-	-	-
Scrotal	2	-	-	-
Perineal	1	-	-	-

Hasil visualisasi pada gel elektroforesis dengan menggunakan sinar ultraviolet pada multipleks A dan multipleks B ditampilkan dalam gambar 3 dan gambar 4 berikut.



Gambar 3. Hasil visualisasi produk PCR multipleks A pada gel agarosa.

Kolom 1 adalah sampel normal, kolom 2 adalah kontrol laki-laki normal, kolom 3 adalah kontrol perempuan normal, kolom 4 adalah blangko dan kolom 5 adalah 100bp *Ladder DNA Marker*



Gambar 4. Hasil visualisasi produk PCR multipleks B pada gel agarosa.

Kolom 1 dan 2 adalah sampel mutasi AZFa (sY86), kolom 3 adalah sampel mutasi AZFab (sY86 dan sY127), kolom 4 adalah kontrol laki-laki normal, kolom 5 adalah kontrol perempuan normal, kolom 6 adalah blangko dan kolom 7 adalah 100bp *Ladder DNA Marker*. Anak panah menunjukkan bagian yang mutasi.

IV.2 Pembahasan

Mekanisme diferensiasi organ kelamin secara normal diawali dengan adanya stimulus dari gen SRY (TDF) pada lengan pendek kromosom Y yang berperan menstimulasi perkembangan sel-sel germinal primordial menjadi testis.¹ Gen SRY selain mengatur perkembangan testis dengan menginduksi sekresi faktor kemotaktik yang menyebabkan tubulus dari saluran mesonefrik melakukan penetrasi ke gonad dan merangsang perkembangan testis lebih lanjut, juga mengatur diferensiasi sel-sel Sertoli dan sel-sel Leydig dimana sel Sertoli akan memproduksi AMH sedangkan sel Leydig memproduksi testosteron yang dapat dikonversi menjadi dihidrotestosteron untuk mengatur diferensiasi organ eksternal.⁴⁸

Kemudian testis akan memproduksi hormon testosteron dan anti Mullerian. Lalu HCG plasenta merangsang sel-sel Leydig untuk memproduksi hormon testosteron.¹ Testosteron dengan bantuan reseptor androgen akan mempengaruhi perkembangan duktus Wolffian menjadi vas deferens, vesikula seminalis dan prostat. Sebagian testosteron kemudian dikonversi dengan bantuan enzim 5α -reduktase menjadi metabolitnya yaitu 5-dihidrotestosteron.²⁶ Dihidrotestosteron akan aktif apabila berikatan dengan reseptor-reseptor androgen dan jaringan-jaringan genital. Hasil virilisasi oleh hormon ini akan memberikan efek antara lain menjauhnya jarak antara anus dan struktur genital, diikuti oleh pemanjangan phallus, pembentukan penis urethra dan perkembangan prepuce. Penis urethra terbentuk karena hasil fusi pada urethra endodermal dari bagian proksimal ke

distal. Sedangkan prepuce terbentuk dari fusi urethra ektodermal. Hipospadia dapat terjadi karena kegagalan fusi pada lipatan urethra endodermal.¹

Hasil penelitian menunjukkan proporsi mutasi gen AZF pada 31 pasien hipospadia murni yang diamati yaitu 9,7% mutasi AZFa dan 3,2% mutasi AZFab serta tidak ditemukan adanya mutasi AZFc (Tabel 5). Hasil penelitian terdahulu juga tidak menemukan adanya mutasi subregion AZFc pada pasien hipospadia murni.¹⁰ Namun hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai data awal ditemukannya mutasi subregion AZFa dan AZFab pada pasien hipospadia murni. Kemudian ditinjau dari proporsi mutasi gen AZF secara umum pada pasien infertil tanpa hipospadia kasus ini sangat berbeda. Hasil penelitian di *Institute of Reproductive Medicine* di Munster menemukan 3% mutasi AZFa, 9% mutasi AZFb, 79% mutasi AZFc, 6% mutasi AZFbc dan 3% mutasi AZFabc.⁴⁶ Penelitian lain juga menemukan frekuensi kejadian mutasi subregion AZFa ada pada urutan terendah yaitu hanya 5% kemudian frekuensi AZFb 16% serta frekuensi AZFc 60% dan kombinasi mutasi dua atau tiga subregion dalam satu individu 14%.³⁷ Peneliti lain menemukan mutasi AZFc sebesar 37,5% dengan 12,5% dari penderita mengalami azoospermia.⁷ Perbedaan proporsi mutasi gen AZF pada kasus hipospadia dengan kasus infertil secara umum dapat mendukung asumsi adanya hubungan antara kejadian hipospadia dengan mutasi gen AZF.

Ditinjau dari komposisi gennya, subregion gen AZFa terbagi menjadi dua sekuens yaitu sY86 yang berukuran 320bp dan sY84 yang berukuran 326bp (Tabel 4) serta memiliki dua gen utama yaitu DFFRY dan DBY^{3,33,46} yang terekspresi pada tiga jaringan yaitu otak, prostat dan testis.³² Gen-gen tersebut juga bertanggung jawab pada proses spermatogenesis.³² Delesi AZFa secara keseluruhan akan menghilangkan sekitar 792kb termasuk gen DFFRY dan DBY.⁴⁶ Delesi AZFa pada salah satu sekuens baik sY86 atau sY84 akan menghilangkan salah satu gen baik itu DFFRY maupun DBY yang akan menampilkan fenotip testis yang berbeda pula.⁴⁶

Penelitian terdahulu menemukan adanya perbedaan target ekspresi antara gen DFFRY dan DBY. DFFRY terekspresi khusus pada sel-sel germinal dari testis sedangkan DBY terekspresi khusus pada sel-sel somatiknya.¹³ Sedangkan sel-sel somatik pada testis meliputi sel-sel Leydig. Mutasi AZFa yang terjadi pada penelitian ini kemungkinan menghilangkan gen DBY yang terekspresi pada sel-sel somatik dan mengakibatkan disfungsi sel-sel Leydig. Disfungsi sel-sel Leydig tersebut mengganggu proses produksi hormon testosteron. Defisiensi daripada testosteron akan mengarah pada kelainan perkembangan organ-organ kelamin termasuk organ eksternal. Dari sini dapat kita ambil kesimpulan bahwa gen DBY kemungkinan besar ikut berperan dalam proses diferensiasi jaringan-jaringan genital baik internal maupun eksternal.

Subregion AZFb terbagi atas dua sekuens yaitu sY127 yang berukuran 274bp dan sY134 yang berukuran 301bp (Tabel 4) serta memiliki

gen utama RBMY yang terekspresi pada testis³³ khususnya pada perkembangan sel-sel germinal³⁵, dan gen-gen lain seperti PRY (PRY1 dan PRY2) yang bertanggung jawab pada proses spermatogenesis³⁶ dan HSFY yang mutasinya menyebabkan infertilitas berat pada laki-laki.³⁷ Mutasi pada AZFb proksimal dengan AZFa merupakan penyebab kecacatan berat pada proses spermatogenesis dan merupakan faktor penyebab SCOS yaitu hilangnya sel-sel germinal pada jaringan testis^{23,34} atau disebut juga *germinal cell aplasia*⁴⁰ dan merupakan penyebab utama azoospermia.³ Laki-laki dengan mutasi gen AZFb akan mengalami penghambatan proses meiosis. Sedangkan mutasi pada sebagian gen AZFb yang distal menyebabkan produksi sperma yang sedikit (oligospermia). Dari hasil penelitian tersebut tidak ditemukan fakta yang mendukung bahwa mutasi gen RBM ikut memicu terjadinya hipospadia. Namun yang pasti mutasi AZFb pada pasien dalam penelitian ini kemungkinan besar menyebabkan terganggunya proses spermatogenesis sehingga perlu dilakukan terapi lanjut pada pasien apabila pasien ingin memperoleh keturunan.

Fakta lain yang mendukung adanya hubungan antara mutasi AZF dengan kejadian hipospadia adalah ditemukannya mutasi reseptor androgen berupa pengulangan trinukleotida CAG pada kasus azoospermia dan oligospermia berat¹¹ yang mana kedua kasus tersebut sering berkaitan dengan kasus mutasi AZFa dan AZFb. Reseptor androgen berperan penting dalam proses pengikatan hormon androgen baik testosteron terhadap duktus wolffian maupun dihidrotestosteron terhadap jaringan-jaringan genital

eksternal. Mutasi pada reseptor androgen akan menghambat proses diferensiasi duktus wolffian menjadi organ kelamin internal dan proses diferensiasi sinus urogenital menjadi organ kelamin eksternal.

Ada dua pendekatan yang dapat dijadikan sebagai acuan untuk menghubungkan antara kejadian hipospadia dengan mutasi gen AZF yang terjadi. Pendekatan pertama adalah adanya pustaka yang menyebutkan bahwa gen DBY pada subregion AZFa selain terekspresi pada sel-sel germinal juga terekspresi pada sel-sel somatik dari testis¹³ dimana sel-sel somatik pada testis meliputi sel-sel Leydig. Disfungsi dari sel Leydig akibat mutasi pada gen DBY akan menghambat produksi testosteron yang berperan dalam mengatur diferensiasi organ-organ kelamin internal dan eksternal. Pendekatan kedua adalah adanya pustaka yang menemukan mutasi reseptor androgen berupa pengulangan CAG telah ditemukan pada kasus azoospermia dan oligospermia berat¹¹ dimana mutasi AZFa dan AZFb bertanggung jawab terhadap dua kasus tersebut.

Pendekatan yang paling kuat sebagai dasar untuk menghubungkan kasus mutasi AZF dengan kejadian hipospadia adalah pendekatan pertama yaitu mutasi AZFa yang kemungkinan besar menghilangkan gen DBY yang terekspresi pada sel-sel germinal dan sel-sel somatik/ sel-sel Leydig dari testis. Namun demikian mutasi pada AZFa ini tidak dapat dikatakan sebagai faktor penyebab langsung terjadinya hipospadia karena faktor-faktor lain juga berpengaruh terhadap terjadinya penyakit ini. Penelitian ini memiliki kelemahan-kelemahan diantaranya penemuan mutasi gen AZF tidak diikuti

dengan konfirmasi deteksi STS (*Sequence Tag Site*) bagian proksimal dan distal. Oleh karena itu perlu penelitian lebih lanjut lagi untuk mendukung hasil penelitian ini. Penelitian yang disarankan adalah untuk mendeteksi pada STS bagian proksimal dan distal dari masing-masing subregion gen AZF yang tidak diamati pada penelitian ini sebagai tindak lanjut ditemukannya mutasi AZFa dan AZFab. Namun demikian hasil penelitian ini tetap dapat dijadikan bahan pertimbangan yang cukup penting untuk melakukan pemeriksaan gen AZF pada penderita hipospadia dengan memperhatikan kondisi klinis yang mendukung.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Distribusi region gen AZF pada 31 pasien hipospadia murni adalah 9,7% mutasi subregion AZFa, 3,2% mutasi subregion AZFab dan tidak ditemukan mutasi pada subregion AZFc maupun gen SRY.

V.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya adalah dilakukannya penelitian untuk mendeteksi STS gen AZF pada bagian proksimal dan distal dari masing-masing subregionnya. Hasil penelitian ini juga disarankan dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam konseling dan pengelolaan pasien hipospadia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Leung AKC, Robson WLM. Hypospadias: an update. *Asian J Androl* 2007; 9(1):16-22.
2. Vos JG, Dybing E, Greim HA, et al. CSTE Opinion on Human and Wildlife Health Effects of Endocrine Disrupting Chemicals, with Emphasis on Wildlife and on Ecotoxicology Test Methods. Report of the Working Group on Endocrine Disrupters of the Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) of DG XXIV, Consumer Policy and Consumer Health Protection 1999.
3. Dohle GR, Jungwirth A, Colpi G, Giwercman A, Diemer T, Hargreave TB. Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology* 2007.
4. Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular Dysgenesis Syndrome: An Increasingly Common Developmental Disorder with Environmental Aspects. *Hum Reprod* 2001; 16(5):972-8.
5. Papenhausen P, Tran H. Genetic Causes of Male Infertility. *Laboratory Corporation of America* 2006.
6. DeCherney AH. Infertility: Evaluation and Treatment of the Infertile Couple. *ACP Medicine Online* 2002.
7. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics* 1996; 5(7):933-43.
8. Giachini C, Nuti F, Marinari E, Forti G, Krausz C. Partial AZFc Deletion in Infertile Men with Cryptorchidism. *Hum Reprod* 2007.
9. Rao L, Babu A, Kanakavalli M, et al. Chromosomal Abnormalities and Y chromosome Microdeletion in Infertile Men with Varicocele and Idiopathic Infertility of South Indian Origin. *J Androl* 2004; 25(1).
10. Tateno T, Sasagawa I, Ashida J, Nakada T, Ogata T. Absence of Y-chromosome Microdeletions in Patients with Isolated Hypospadias. *Fertility and Sterility* 2000; 74(2):399-400.
11. Madgar I, Green L, Kent-First M. Genotyping of Israeli Infertile Men With Idiopathic Oligospermia. *Clinical Genetics* 2002; 62:203-7.

12. Foresta C, Garolla A, Bartoloni L. Genetic Abnormalities Among Severely Oligospermic Men Who Are Candidates for Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Clin Endocr Metab* 2005; 90:152-6.
13. Sargent CA, Boucher CA, Kirsch Strepcococcus. The Critical Region of Overlap Defining The AZFa Male Infertility Interval of Proximal Yq Contains Three Transcribed Sequens. *J Med Genet* 1999; 36:670-7.
14. Chen T, Li Q, Xu J, et al. Mutation Screening of BMP4, BMP7, HOXA4 and HOXB6 Genes in Chinese Patients with Hypospadias. *EJHG* 2007; 15:23-8.
15. Silver RI, Russell DW. 5 α -Reductase Type 2 Mutations are Present in Some Boys with Isolated Hypospadias. *The Journal of Urology* 1999; 162:1142-45
16. Mueller RF, Young ID. Emery's Elements of Medical Genetics. Italy: Churchill Livingstone. Printed by Rotolito Lombarda, 2001.
17. Jones KL. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformation. USA: WB Saunders Company, 1997.
18. Harper PS. Practical Genetic Counseling. USA: Oxford University Press, 2003.
19. Baskin LS, Himes K, Colborn T. Hypospadias and Endocrine Disruption: Is There a Connection? *Environ Health Perspect* 2001; 109(11):1175-83.
20. Sutherland RW, Miener JS, Hicks JP, et al. Androgen Receptor Gene Mutations are Rarely Associated with Isolated Penile Hypospadias. *The Journal of Urology* 1996; 156:828-31
21. Fisher JS, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM. Human Testicular Dysgenesis Syndrome: A Possible Model Using In-Utero Exposure of the Rat to Dibuthyl Phthalate. *Hum Reprod* 2003; 3(7):1383-94.
22. Elliott DJ, Cooke HJ. The Molecular Genetics of Male Infertility. *BioEssays* 2005; 19(9):801-9.
23. Vogt PH. Infertility: Genetic Disorders. *Nature Encyclopedia of the Human Genome* 2003; 458-64.
24. Seshagiri PB. Molecular Insights into the Causes of Male Infertility. *J Biosci* 2001; 26(4):429-35.
25. Strachan T, Read AP. Human Molecular Genetics. UK: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1996.
26. Passarge E. Color Atlas of Genetics. New York: Thieme, 2007.

27. Swarna M, Babu SR, Reddy PP. AZFc Deletions in Idiopathic Infertile Males from South India. *Int J Hum Genet* 2003; 3(1):1-4.
28. Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Rossato M, Barboux S, Bortoli AD. Y Chromosome Deletions in Idiopathic Severe Testiculopathies. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):1075-80.
29. Ferlin A, Arredi B, Speltra E, et al. Molecular and Clinical Characterization of Y chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(3):762-70.
30. Liow SL, Yong EL, Ng SC. Prognostic Value of Y deletion Analysis. *Hum Reprod* 2001; 16(1):9-12.
31. Raicu F, Popa L, Apostol P, et al. Screening for Microdeletion in Human Y Chromosome-AZF Candidate Genes and Male Infertility. *J Cell Mol Med* 2003; 7(1):43-8.
32. Lahn BT, Page DC. Functional Coherence of The Human Y Chromosome. *Science* 1997; 278:675-80.
33. Vinci G, Raicu F, Popa L, Popa O, Cocos R, McElrevey K. A Deletion of A Novel Heat Shock Gene on The Y Chromosome Associated with Azoospermia. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(4):295-8.
34. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic Value of Y Deletion Analysis. *Hum Reprod* 2001; 16(8):1543-7.
35. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, et al. Expression of RBM in The Nuclei of Human Germ Cells is Dependent on A Critical Region of The Y Chromosome Long Arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3848-53.
36. Stouffs K, Lissens W, Landuyt LV, Tournaye H, Steirteghem AV, Liebaers I. Characterization of The Genomic Organization, Localization and Expression of Four PRY Genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4). *Mol Hum Reprod* 2001; 7(7):603-10.
37. Tessari A, Salata E, Ferlin A, Bartoloni L, Slongo ML, Foresta C. Characterization of HSFY, a Novel AZFb Gene on The Y Chromosome with a Possible Role in Human Spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(4):253-58.
38. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Bartoloni L, Slongo ML, Foresta C. The Human Y Chromosome's Azoospermia Factor b (AZFb) region: Sequence, Structure, and Deletion Analysis in Infertile Men. *J Med Genet* 2003; 40:18-24.

39. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Yq Microdeletions Azoospermia Factor Candidate Genes and Spermatogenic Arrest. *Journal of Biomolecular Techniques* 2004; 15:176-83.
40. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic Deletions in The Y Chromosome of Infertile Men. *Hum Reprod* 1997; 12(8):1635–41.
41. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of Sperm in Men with Y chromosome Microdeletions of The AZFa, AZFb and AZFc Regions. *Hum Reprod* 2003; 18(8):1660-5.
42. Toth A, Tardy EP, Gombos S, Hajdu K, Batorfi J, Krausz C. AZFc Deletion Detected in A Newborn With Prenatally Diagnosed Yq Deletion. *Prenatal Diagnosis* 2001; 21(4):253-5.
43. Ken-First M, Muallem A, Shultz J, et al. Defining Regions of The Y Chromosome Responsible for Male Infertility and Identification of A Fourth AZF Region (AZFd) by Y Chromosome Microdeletion Detection. *Molecular Reproduction and Development* 1999; 53(1):27-41.
44. Carrara RCV, Yamasaki R, Mazucatto LF, Veludo MAL, Sartorato EL, Pina-Neto JM. Somatic and Germ Cell Cytogenetic Studies and AZF Microdeletion Screening in Infertile Men. *Genet Mol Biol* 2004; 27(4).
45. Sastroasmoro S, Ismael S. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Klinis*. Edisi I. Jakarta: Binarupa Aksara, 1995.
46. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN Best Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Y-Chromosomal Microdeletions. State of The Art 2004. *International Journal of Andrology* 2004; 27:240-49.
47. Simoni M, Bakker E, Eurlings MCM, et al. Laboratory Guidelines for Molecular Diagnosis of Y-Chromosomal Microdeletions. *International Journal of Andrology* 1999; 22:292-99.
48. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 9th Edition. Pennsylvania: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
49. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

LAMPIRAN

Lampiran 1. Data pasien hipospadia yang masuk dalam sampel penelitian.

No Sampel	Umur (tahun)	Tipe hipospadia	Kariotip
H01	13	Penile	46,XY
H02	14	Penile	46,XY
H03	22	Penile	46,XY
H04	15	Penile	46,XY
H05	15	Penile	46,XY
H06	15	Penoscrotal	46,XY
H07	13	Penile	46,XY
H08	14	Coronal	46,XY
H09	13	Penile	46,XY
H10	13	Perineal	46,XY
H11	14	Scrotal	46,XY
H12	11	Penile	46,XY
H13	13	Coronal	46,XY
H14	11	Penile	46,XY
H15	14	Penile	46,XY
H16	13	Penile	46,XY
H17	13	Penile	46,XY
H18	13	Penile	46,XY
H19	14	Penile	46,XY
H20	11	Penile	46,XY
H21	14	Penile	46,XY
H22	17	Penile	46,XY
H23	12	Penile	46,XY
H24	14	Penile	46,XY
H25	14	Penile	46,XY
H26	13	Penoscrotal	46,XY
H27	12	Penile	46,XY
H28	11	Penile	46,XY
H29	13	Penile	46,XY
H30	13	Penile	46,XY
H31	15	Scrotal	46,XY

Lampiran 2. Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk ekstraksi DNA

Bahan-bahan:

No	Nama	Keterangan / Komposisi
1	EDTA 0,5M	Diteteskan 1 tetes pada tabung vakum penampung darah sampel
2	Buffer lisis	8,2g NH ₄ Cl + 1g KHCO ₃ + 0,037g EDTA + H ₂ O (add sampai 1L) pH campuran : 7,5
3	Buffer TE kuat	0,969g TrisBase + 0,744g EDTA + H ₂ O (add sampai 400ml) pH campuran : 7,5
4	Buffer TE normal	0,242g TrisBase + 0,074g EDTA + H ₂ O (add sampai 200ml) pH campuran : 8
5	SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) 10%	Perbandingan SDS : H ₂ O adalah 1 : 9
6	Proteinase K 10mg/ml	10mg Proteinase K + H ₂ O (add sampai 1ml)
7	NaCl 6M	175g NaCl + H ₂ O (add sampai 500ml)
8	Ethanol 70%	70ml Ethanol Absolut + 30ml H ₂ O
9	Ethanol Absolut	Ethanol 100%
10	H ₂ O	Aqubidedst

Alat-alat:

No	Nama	Keterangan
1	Sprit	Ukuran 10ml
2	Tabung vakum	Ukuran 10ml berisi 1 tetes EDTA 0,5M
3	Tabung plastik	Ukuran 50ml dan 15ml dengan tutup ulir
4	Sentrifuse	Untuk mengendapkan DNA
5	Pipet karet	Pipet tetes dari kaca dengan penyedot dari karet
6	Waterbath	Untuk inkubasi/ pencampuran dengan suhu tertentu
7	Tabung eppendorf	Ukuran 1,5ml
8	Jarum spuit steril	Untuk mengambil DNA

Lampiran 3. Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk PCR

Bahan-bahan:

No	Nama	Keterangan / Komposisi	
1	<i>AmpliTaq Enzyme DNA polymerase</i>	Produksi <i>Applied Biosystems</i> (Roche)	
2	<i>PCR buffer</i> 10X + MgCl ₂ 15mM	Produksi <i>Applied Biosystems</i> (Roche)	
3	<i>dNTPs</i> 8,33mM	- Larutan kerja dGTP 5mM dalam 200ul: 100ul dGTP stok 10mM + 100ul H ₂ O - Larutan kerja (dATP, dCTP dan dTTP) 10mM dalam 200ul: 20ul (dATP, dCTP dan dTTP) stok 100mM + 180ul H ₂ O - Larutan kerja (dATP, dCTP dan dTTP) 2mM + dGTP 0,5mM dalam 200ml: 120ul (dATP, dCTP dan dTTP) 2mM + 10ul dGTP 0,5mM + 70ul H ₂ O	
4	Primer multipleks untuk 34 reaksi (31 sampel + 2 kontrol + 1 blangko) dengan masing-masing reaksi menggunakan 5ul primer.	Multipleks A: 12ul sY86 F (45,04pmol) 12ul sY86 R (56,60pmol) 7ul sY127 F (51,91pmol) 7ul sY127 R (50,39pmol) 4ul sY254 F (43,74pmol) 4ul sY254 R (39,07pmol) 7ul ZFY F (39,41pmol) 7ul ZFY R (53,93pmol) 7ul SRY F (53,6pmol) 7ul SRY R (65,26pmol) 96ul mQ Jumlah : 170ul	Multipleks B: 8ul sY84 F (65,44pmol) 8ul sY84 R (46,08pmol) 12ul sY134 F (53,85pmol) 12ul sY134 R (46,64pmol) 4ul sY255 F (60,13pmol) 4ul sY255 R (48,05pmol) 7ul ZFY F (39,41pmol) 7ul ZFY R (53,93pmol) 7ul SRY F (53,6pmol) 7ul SRY R (65,26pmol) 94ul mQ Jumlah : 170ul
5	mQ	Aquabidest	

Alat-alat:

No	Nama	Keterangan
1	Mikropipet	Merek Eppendorf dengan ukuran yang dapat diatur
2	Tabung eppendorf	Ukuran 0,5ml
3	Vortex	Merek Genie2 Produksi Scientific Industries, Inc Bohemia, New York, USA Spesifikasi : Model : G560E Tegangan : 240V Arus : 0,5Amps Frekuensi : 50Hz
4	Mesin PCR	Merek Applied Biosystems Model : Gene Amp PCR System 9700

Lampiran 4. Daftar spesifikasi bahan dan alat untuk elektroforesis

Bahan-bahan:

No	Nama	Keterangan / Komposisi
1	Buffer TBE 0,5X	Buffer TBE 5X (stok) 100ml : 5,4g TrisBase + 2,75g Boric Acid + 2ml EDTA 0,5M + H ₂ O (add sampei 100ml) pH larutan : 7,9-8,3 (untuk menurunkan pH ditambahkan HCl dan untuk menaikkan pH ditambahkan NaOH). Buffer TBE 0,5X 500ml : 50ml Buffer TBE 5X + 450ml Aquabidest
2	Aquabidest	Air suling
3	Agarosa	Merek : Metaphor Agarose No. Katalog : 50180E Produksi : Cambrex Bio Science Rockland, Inc Pembuatan Agarosa 4% : 3g Agarosa + 75ml Buffer TBE 0,5X + 10ul etidium bromida
4	Etidium bromida	Berperan sebagai pewarna yang sifatnya berpendar jika terkena sinar ultra violet
5	Loading buffer tipe I	Komposisi: 0,25% bromophenol blue + 0,025% xylene cyanol FF + 40% (w/v) sucrose dalam air (teperatur penyimpanan 4 ^o C Peran: menambah densitas sampel, mempermudah sampel masuk dalam sumur gel, memberikan warna pada sampel, dan memudahkan proses loading karena pada medan listrik akan bergerak dari katoda (kutub negatif) ke arah anoda (kutub positif) ⁴⁹
6	Marker	100bp <i>Ladder DNA Marker</i> dengan kapasitas 100 – 2000bp Produksi : Axygen biosciences

Alat-alat:

No	Nama	Keterangan / Komposisi
1	Mikropipet	Merek eppendorf dengan ukuran yang bisa diatur
2	Tangki elektroforesis	Digunakan untuk menampung buffer dan gel agarosa pada proses elektroforesis
3	Pencetak agarosa	Digunakan untuk mencetak agarosa dilengkapi dengan sisir untuk membuat sumur-sumur pada gel
4	<i>Hot magnetic stirer</i>	Digunakan untuk melarutkan buffer dan untuk menghomogenkan campuran dalam pembuatan gel agarosa
5	Mesin elektroforesis	Merek : Bio-Rad Model : Power Pac 300 Produksi : Jordan Scientific, co. Power : 195 VA Frekuensi : 50-60Hz