

**ANALISIS POLIMORFISME V89L GEN *SRD5A2* DAN
MIKRODELESI GEN *AZF* DAN *SRY* PADA PASIEN
*HIPOSPADIA ISOLATED***

***POLYMORPHISM ANALYSIS OF V89L IN SRD5A2 GENE AND
MICRODELETION OF AZF AND SRY GENE IN ISOLATED
HYPOSPADIA PATIENTS***



Tesis

untuk memenuhi sebagian persyaratan mencapai derajat Sarjana S-2

Magister Ilmu Biomedik

Nura Eky Vikawati

22010112420046

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG**

2015

LEMBAR PENGESAHAN

Tesis

**ANALISIS POLIMORFISME V89L GEN *SRD5A2* DAN MIKRODELESI GEN
AZF DAN *SRY* PADA PASIEN HIPOSPADIA *ISOLATED***

***POLYMORPHISM ANALYSIS OF V89L IN SRD5A2 GENE AND
MICRODELETION OF AZF AND SRY GENE IN ISOLATED HYPOSPADIA
PATIENTS***

Oleh:

Nura Eky Vikawati

NIM: 22010112420046

Telah dipertahankan di depan penguji pada tanggal 9 Juni 2015

Dan disetujui oleh,

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. A. Zulfa Juniarto, Msi.Med, Sp.And, PhD

NIP. 197006081997021001

Prof. Dr. Sultana MH Faradz, PhD

NIP. 19520202 197901 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

Dr. A. Zulfa Juniarto, Msi.Med, Sp.And, PhD

NIP. 197006081997021001

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini 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 atau lembaga pendidikan lainnya, serta tidak terdapat unsur-unsur yang tergolong Plagiarism sebagaimana yang dimaksud dalam Permendiknas No. 17 Tahun 2010. Pengetahuan yang diperoleh dari hasil penerbitan maupun yang belum atau tidak diterbitkan, sumbernya dijelaskan di dalam tulisan dan daftar pustaka.

Semarang, Juni 2015

Nura Eky Vikawati

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas

Nama : Nura Eky Vikawati

Tempat/Tanggal lahir : Kendal, 17 Februari 1989

Jenis Kelamin : Perempuan

B. Riwayat Pendidikan

1. SDN Sambongsari II : Lulus tahun 2000
2. SMPN I Weleri : Lulus tahun 2003
3. SMAN 3 Semarang : Lulus tahun 2006
4. Pendidikan Dokter FK UNDIP : Lulus tahun 2012
5. Magister Ilmu Biomedik UNDIP : 2012 hingga sekarang

C. Riwayat Pekerjaan

-

D. Kegiatan Penelitian

1. Study of risk factors in isolated hypospadias patients - Skripsi - 2010
2. Uji Diagnostik *Segmental Duplication-High Resolution Melting (HRM) Analysis* Untuk Mendeteksi Kelainan Jumlah Kromosom – RISBIN IPTEKDOK - 2014.

KATA PENGANTAR

Hipospadia merupakan salah satu kondisi yang dapat menyulitkan orang tua dalam menentukan jenis kelamin bayinya. Hingga saat ini penyebabnya belum jelas dan dianggap sebagai suatu penyakit multifaktorial. Banyak penelitian yang mencari tahu dan mengaitkan faktor genetik dengan peningkatan risiko penyakit. Salah satu diantaranya adalah gen *SRD5A2*. Pada pasien ini juga beresiko terjadi infertilitas. Skrining mikrodlesi *AZF* dan *SRY* juga menjadi variabel dalam penelitian ini dikarenakan data hasil skrining tersebut menjadi dasar untuk dilakukannya konseling genetik pada kasus hipospadia. Hal tersebut yang melatarbelakangi disusunnya **“Analisis polimorfisme V89L gen *SRD5A2* dan mikrodlesi gen *AZF* dan *SRY* pada pasien hipospadia”**

Dalam penyusunan tesis ini tentunya penulis mendapat dukungan dan bantuan dari banyak pihak. Puji syukur kehadiran Allah SWT atas rahmat dan kemudahan yang dikaruniakan sehingga tulisan ini dapat selesai dengan baik. Terimakasih yang tak terhingga ditujukan kepada Dr. A. Zulfa Juniarto, Msi.Med, Sp.And, PhD selaku pembimbing I sekaligus Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, Prof.dr. Sultana MH Faradz, PhD selaku pembimbing II sekaligus Ketua Konseling Genetika Program Magister Ilmu Biomedik Program Pascasarjana Universitas Diponegoro, dr. Ardy Santosa, Sp. U selaku penguji dan atas izin beliau sampel hipospadia dapat digunakan, serta terimakasih pula kepada dr. Tri Indah Winarni, Msi.Med, PhD atas masukan beliau

sebagai penguji tesis. Penulis juga berterima kasih kepada dr. Hardian atas bantuan analisis statistik, pihak pemberi beasiswa unggulan Kemendikbud, orang tua, rekan rekan sejawat S2, rekan-rekan analis CEBIOR, dan pihak lain yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari tesis ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu penulis mengharapkan saran dan masukan demi kesempurnaan tulisan ini. Harapan penulis semoga tesis ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu genetika.

Semarang, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|------|
| SAMPUL | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | ii |
| HALAMAN PERNYATAAN | iii |
| RIWAYAT HIDUP | iv |
| KATA PENGANTAR | v |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR GAMBAR | x |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR ISTILAH | xii |
| DAFTAR SINGKATAN | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| ABSTRAK | xvii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| I.1 Latar Belakang | 1 |
| I.2 Rumusan Masalah | 3 |
| I.3 Tujuan | 3 |
| I.4 Manfaat | 4 |
| I.5 Orisinalitas | 4 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | 8 |
| II.1 Epidemiologi Hipospadia | 8 |
| II.2 Diagnosis dan Klasifikasi Hipospadia | 9 |
| II.3 Faktor Risiko Hipospadia | 10 |
| II.4 Peran Genetik Dalam Hipospadia | 12 |
| II.5 Gen <i>SRD5A2</i> dan Hipospadia | 13 |
| II.6 Polimorfisme Gen <i>SRD5A2</i> | 15 |
| II.7 Gen <i>AZF</i> dan <i>SRY</i> | 16 |
| II.8 Konseling genetik pada pasien hipospadia | 21 |

| | |
|---|----|
| BAB III KERANGKA TEORI DAN KERANGKA KONSEP | 22 |
| III.1 Kerangka Teori | 22 |
| III.2 Kerangka Konsep | 23 |
| BAB IV METODOLOGI PENELITIAN | 24 |
| IV.1 Ruang Lingkup Penelitian | 24 |
| IV.2 Lokasi Penelitian | 24 |
| IV.3 Waktu Penelitian | 24 |
| IV.4 Desain Penelitian | 24 |
| IV.5 Populasi dan Sampel | 25 |
| IV.5.1. Populasi | 25 |
| IV.5.2. Sampel | 25 |
| IV.5.2.1. Kriteria Inklusi dan eksklusi Sampel | 25 |
| IV.5.2.2. Kriteria Inklusi dan eksklusi Kontrol | 26 |
| IV.5.2.3. Cara Pemilihan Subjek | 26 |
| IV.5.2.4. Pemeriksaan Klinis | 26 |
| IV.5.2.5. Pengumpulan Sampel | 27 |
| IV.5.2.6 Besar Sampel | 27 |
| IV.6 Metode | 28 |
| IV.7 Variabel | 31 |
| IV.8 Definisi Operasional | 31 |
| IV.9 Pengolahan dan Analisis Data | 32 |
| IV.10 Alur Penelitian | 33 |
| BAB V. HASIL | 34 |
| BAB VI. PEMBAHASAN | 41 |
| VI. 1. Diskusi | 41 |
| VI. 2. Keterbatasan Penelitian | 48 |
| BAB VII. SIMPULAN SARAN | 50 |
| VII. 1 Simpulan | 50 |
| VII. 2 Saran | 50 |

| | |
|-------------------------|----|
| RINGKASAN | 52 |
| DAFTAR PUSTAKA | 54 |
| LAMPIRAN-LAMPIRAN | 61 |

DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar II.1. Beragam klasifikasi berdasarkan lokasi muara uretra | 9 |
| Gambar II.2. Peta lokasi gen SRD5A2 pada kromosom 2. | 14 |
| Gambar II.3. Bagan skema gen-gen yang berperan dalam perkembangan genitalia laki-laki | 15 |
| Gambar II.4. Skema kromosom Y yang memperlihatkan ketiga region <i>AZF</i> dan gen-gen yang berada di dalamnya | 17 |
| Gambar II.5. Enam tipe mikrodelesi <i>AZF</i> dan dampak fenotipnya | 19 |
| Gambar V.1. Karakteristik pasien sampel hipospadia | 34 |
| Gambar V.2. Visualisasi produk PCR pada gel elektroforesis 0,8% | 35 |
| Gambar V.3. Visualisasi produk RFLP pada gel agarose 3% | 36 |
| Gambar V.4. Hasil visualisasi RFLP menggunakan gel poliacrilamide 10% | 36 |
| Gambar V.5. Hasil kromatogram sekuensing | 37 |
| Gambar V.6. Distribusi fenotipe hipospadia | 39 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|--|
| Tabel V.1. Tabel Distribusi genotipe kelompok hipospadia dan kelompok normal...38 | |
| Tabel V.2. <i>Cross-tabulation</i> kelompok MUTAN vs WT (<i>Wildtype</i>)38 | |
| Tabel V.3. Frekuensi alel C dan G39 | |
| Tabel V.4. Fenotipe vs Mikrodelesi <i>AZF</i> dan <i>SRY</i>40 | |

DAFTAR ISTILAH

| | |
|--------------------------------------|--|
| Endocrine disrupting chemical (EDC) | Zat kimia yang dalam dosis tertentu dapat mempengaruhi endokrin (atau sistem hormon) di mamalia. |
| Familial clustering | suatu kondisi penyakit yang mengenai lebih dari satu anggota keluarga dimana risiko terkenanya tidak bisa diperkirakan. |
| First degree/kerabat derajat pertama | Anggota keluarga yang memberikan 50% gen mereka dengan individu tertentu dalam keluarga, termasuk dalam kerabat derajat pertama yaitu orangtua, saudara kandung, dan anak. |
| Hipospadia | Suatu malformasi kongenital muara uretra yang tidak berada di ujung penis melainkan di sepanjang sisi depan/anterior penis |
| PCR | Suatu teknik biokimia yang mengamplifikasi sekuens urutan DNA tertentu menjadi ribuan atau jutaan copy. |
| PCR- Multipleks | . Modifikasi PCR untuk deteksi cepat delesi atau duplikasi pada gen yang besar. |
| RNA-biding protein | Suatu protein yang berikatan dengan RNA untai tunggal/ganda dan berperan dalam pembentukan kompleks ribonucleoprotein |
| Polimorfisme | Variasi alamiah dari gen, sekuens DNA, atau kromosom yang tidak memiliki dampak pada individu dan muncul dalam frekuensi yang cukup tinggi (>1%) di populasi umum |
| RFLP | Perbedaan sekuens DNA homolog yang dapat |

| | |
|------------|--|
| | dideteksi dengan keberadaan panjang fragment yang berbeda setelah sampel DNA dicerna oleh enzim endonuklease restriksi spesifik. |
| Sekuensing | Suatu proses untuk menentukan urutan nukleotida dari fragmen DNA yang ada. |

DAFTAR SINGKATAN

| | |
|-----------------|---|
| AR | : Androgen Receptor |
| ATF3 | : Activating Transcription Factor-3 |
| AZF | : Azoospermia Factor |
| BBLR | : Bayi Berat Lahir Rendah |
| Bmps | : Bone Morphogenetic Proteins |
| CEBIOR | : Center for Biomedical Research |
| <i>DBY</i> | : Dead Box Polypeptide Y |
| DHT | : Dihydrotestosteron |
| DNA | : Deoxyribonucleic acid |
| EDC | : Endocrine Disrupting Chemical |
| ESR | : Estrogen Receptor |
| Fgf-10 | : Fibroblast Growth Factor-10 |
| FGF | : Fibroblast Growth Factors |
| FKBP52 | : FK506-Binding Protein 4 |
| hCG | : Human Chorionic Gonadotrophin |
| Hoxa-13 | : Homeobox A13 |
| HSD17 β 3 | : 17 β -hydroxysteroid Dehydrogenase 3 |
| <i>HSFY</i> | : Heat Shock Transcription Factor, Y chromosome |
| IH | : Isolated Hypospadias |
| MAF | : Minor Allele Frequency |
| MAMLD1 | : Mastermind-like Domain Containing 1 |
| OR | : Odd Ratio |
| OUE | : Ostium Urethra Externum |
| PAGE | : Polyacrilamide Gel Electrophoresis |

| | |
|---------------|---|
| PCR-RFLP | :Polimerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism |
| <i>PRY</i> | : Protein Kinase Y Linked |
| <i>RBMY</i> | : RNA binding motif on Y |
| Shh | : Sonic Hadgehox |
| <i>SRD5A2</i> | : Steroid 5 Alpha Reductase type 2 |
| <i>SRY</i> | : Sex Determining Region Y |
| SNP | : Single Nucleotide Polymorphism |
| TPK | : Tim Penyesuaian Kelamin |
| <i>USP9Y</i> | : Ubiquitin Specific Peptidase 9, Y-linked |
| <i>UTY</i> | : Ubiquitously Transcribed TPR Gene on Y chromosome |
| <i>ZFY</i> | : Zinc Finger Protein, Y-linked |
| <i>ZFX</i> | : Zinc Finger Protein, X-linked |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|---|----|
| Lembar Ethical Clearance | 60 |
| Posisi primer pada ekson 1 sekuens gen SRD5A2 | 61 |
| <i>Silver staining</i> / Pengecatan silver | 62 |
| Pemeriksaan Mikrodelesi <i>AZF</i> dan <i>SRY</i> dengan PCR multipleks | 63 |
| Lembar analisis statistik | 76 |

ABSTRAK

Latar belakang : Hipospadia merupakan kelainan di muara kencing bayi laki-laki yang banyak dijumpai. Kelainan ini terjadi karena kegagalan perkembangan genitalia ekterna. Faktor genetik salah satunya polimorfisme V89L gen *SRD5A2* dikaitkan dengan peningkatan risiko hipospadia. Pasien hipospadia berisiko tinggi mengalami infertilitas, salah satu penyebabnya adalah mikordelesi *AZF* dan *SRY*. Data mikordelesi ini penting sebagai dasar konseling genetik. Sehingga studi ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme V89L gen *SRD5A2* dan mikordelesi *AZF* dan *SRY* pada pasien hipospadia.

Metode : DNA dari 46 sampel (23 pasien hipospadia dan 23 laki-laki normal) dianalisis menggunakan PCR – RFLP untuk mendeteksi polimorfisme V89L pada nukleotida 265 ekson 1 yang dilanjutkan dengan sekuensing sebagai konfirmasi. Data mikordelesi *AZF* dan *SRY* pada 23 sampel dilakukan dengan metode PCR multipleks pada penelitian sebelumnya.

Hasil : *Prevalence ratio* alel mutan (alel C) vs *WT* (alel G) adalah 1.0; 95% CI: 0.268-3.729 ,dengan nilai $p= 1.0$. Frekuensi alel C sedikit lebih tinggi dari alel G dari keseluruhan sampel yaitu 0,51 dan 0,49, berturut-turut. Terdapat 8,7% (n=2) dari 23 sampel yang memiliki mikordelesi *AZF*a. Keduanya mengalami mikordelesi parsial *AZF*a dengan fenotipe penile dan penoscrotal.

Simpulan : Tidak dapat disimpulkan apakah alel C dari polimorfisme V89L gen *SRD5A2* berpengaruh terhadap peningkatan risiko hipospadia dikarenakan jumlah sampel yang terlalu kecil dan ditemukannya mikordelesi *AZF*a menjadi dasar yang penting dalam konseling genetik pada pasien hipospadia.

Kata kunci : hipospadia , *SRD5A2* , polimorfisme, V89L, Mikordelesi, *AZF*, *SRY*

ABSTRACT

Background : Hypospadias is one of the most common urethral malformation in male babies. It happens due to developmental failure of external genitalia formation. Polymorphism of V89L of *SRD5A2* gene is associated with the increasing risk of hypospadias. Hypospadias patients have a high risk of infertility. One of the causes is microdeletion of *AZF* and *SRY* gene. This microdeletion data is important as a guide in genetic counseling. The aim of this study is to know V89L polymorphism in *SRD5A2* gene and microdeletion of *AZF* and *SRY* in hypospadias patients.

Method : DNA of 46 samples (23 hypospadias samples and 23 normal males) were analysed by using PCR – RFLP to detect V89L polymorphisms in nucleotide 265 of exon 1 in *SRD5A2* gene. Sequencing was done as confirmation. Microdeletion of *AZF* and *SRY* data in 23 hypospadias samples were done by using multiplex PCR method in previous study.

Result : Prevalence ratio of mutant allele (allele C) vs *WT* (allele G) was 1.0; 95% CI: 0.268-3.729, p value = 1.0 (not significant). C allele frequency was slightly higher than G allele in all samples, 0,51 and 0,49, respectively. There were 8,7% (n=2) of 23 samples who have *AZF* α partial microdeletion with phenotype penile and penoscrotal, respectively.

Conclusion : It could not be concluded whether C allele in V89L polymorphism of *SRD5A2* gene was associated with increasing risk of hypospadias due to small sample size. The finding of partial microdeletion of *AZF* α became an important guide in genetic counseling of hypospadias patients.

KEYWORD : Hypospadias , Polymorphism, *SRD5A2* , V89L, Microdeletion, *AZF*, *SRY*.