


LAMPIRAN

Posisi primer pada ekson 1 sekuens gen *SRD5A2*

TCGGAACCGCGCCAGGGCTGGACGCGGCGAGGTGGGAGGCAGGATGGAGGGGCGGGAGCC
 AAGGCCGAGGGGGCGGACACGGGTGGCGTCTGGCGCTCCATAAAGGGTTGCGGGGGCCG
 CGCTCTTCTGGGAGG **GCAGCGGCCACCGGCGAGG** AACACGGCGCGATGCAGGTTCACT
 GCCAGCAGAGCCCAGTGCTGGCAGGCAGCGCCACTTTGGTCGCCCTTGGGGCACTGGCCT
 TGTACGTCGCGAAGCCTCCGGCTACGGGAAGCACACGGAGAGCCTGAAGCCGGCGGCTAC
 CCGCCTGCCAGCCC GCGCCGCTGGTTCCTGCAGGAGCTGCCTTCCTTCGCGGTGCCCGC
 GGGGATCCTCGCCCGGAGCCCCTCTCCCTCTTCGGGCCACCTGGGACGGTACTTCTGGG
 CCTCTTCTGCC **TACATTACTTCCACAG** GTAGCGTTTTTCCCTTGCGGGCGCC **AGTGCAG**
CGCACTGCCCTGCT CCCGGCGTCCAGGAGCGCAGCGTAGAGCGCGCACCGAGGAACGCCA

 : Ekson 1

 : Posisi *forward* dan *reverse primers*

Garis bawah : posisi SNP 265 G>C / V89L

Silver Staining/ Pengecatan Silver

1. Lepaskan gel dari kaca.
2. Cuci gel dengan mili-q 2X
3. Cuci dengan 10% ethanol selama 5 menit (shaker)
4. Buang ethanol dan tambahkan 1% asam nitrat, shaker selama 3 menit
5. Cuci dengan mili-q (2-3X)
6. Tambahkan 150 ml AgNO_3 0,2%, diamkan selama 20 menit dalam ruangan gelap.
7. Buang silver (simpan dalam botol gelap untuk dipakai kembali)
8. Cuci cepat gel dengan 200 ml mili-q+6 tetes formaldehyde
9. Tambahkan pengembang (400 ml NaOH 0,1N+10 tetes formaldehyde)
10. Cuci dengan 250 ml asam asetat 3% biarkan 5 menit.
11. Buang asam asetat (simpan kembali untuk dipakai selanjutnya)
12. Cuci dengan ethanol 10% + 7% gliserin.
13. Keringkan dalam 2 lapis plastik cellophane selama 1-2 hari.

Pemeriksaan Mikrodelesi *AZF* dan *SRY* dengan PCR Multipleks

A. PCR Multipleks⁵⁸

Primer yang digunakan adalah primer untuk gen *AZF*, *SRY*, dan *ZFY*. Primer untuk gen *AZF* terdiri dari 6 sekuens yaitu sY86 dan sY84 untuk *AZF*_a, sY127 dan sY134 untuk *AZF*_b, sY254 dan sY255 untuk *AZF*_c, masing-masing di PCR dengan teknik multipleks. PCR multipleks dibagi menjadi 2 kelompok A dan B untuk memisahkan sekuen yang memiliki perbedaan besar produk yang kecil untuk memudahkan pembacaan (sekuens primer multipleks lihat tabel 1).

Tabel 1. Sekuens primer multipleks gen *AZF* dan *SRY*

Multipleks	Gen/Lokus	Primer Sekuens
A dan B	ZFY-F:	5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3'
	ZFY-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'
	SRY-R:	5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'
A	sY86-F:	5'-GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3'
	sY86-R:	5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'
A	sY127-F:	5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'
	sY127-R:	5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'
A	sY254-F:	5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'
	sY254-R:	5'-GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C-3'
B	sY84-F:	5'-AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT-3'
	sY84-R:	5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'
B	sY134-F:	5'-GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3'
	sY134-R:	5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'
B	sY255-F:	5'-GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'
	sY255-R:	5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'

Gen *SRY* dan *ZFY* disertakan pada masing-masing multipleks tersebut sebagai kontrol internal.⁵⁸ Protokol komposisi campuran PCR multipleks dan tahapan PCR gen *AZF* dapat dilihat pada tabel 2 dan 3 berikut:

Tabel 2. Komposisi campuran PCR multipleks dalam satu reaksi

Bahan	Volume (ul)
PCR Buffer + MgCl ₂	5,0
dNTP's (8,33 mM)	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 PCR gen AZF

Tahap	Suhu (°C)	Periode
Inisiasi	94	3 menit
Denaturasi	94	30 detik
Annealing	55	45 detik
Elongasi	72	45 detik
Elongasi akhir	72	7 menit
Stabilisasi	10	∞
Siklus	35 kali	

B. Elektroforesis

Produk PCR sebanyak 7 ul akan dijalankan dalam gel agarose 4% dengan tegangan 100V selama kurang lebih 2 jam. Visualisasi gen-gen yang terpisah menggunakan Gel Doc (Bio-Rad Laboratories).

C. Data hasil

Hasil dikatakan valid bila pada kolom marker muncul semua galur pita, pada kolom blangko tidak muncul galur pita, pada kolom kontrol laki-laki muncul semua

gen yang diamplifikasi dan pada kolom kontrol perempuan normal muncul pita untuk gen *ZFY*. Ukuran besar produk masing-masing gen ditampilkan dalam tabel 4.

Tabel 4. Besar Produk PCR regio gen *AZF*, *ZFY*, dan *SRY*

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

Analisis Statistik

Crosstabulation Alel vs Kelompok

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
Alel * Kelompok	46	53.5%	40	46.5%	86	100.0%

Alel * Kelompok Crosstabulation

			Kelompok		Total
			Hipospadia	Normal	
Alel	CC	Count	8	5	13
		% within Kelompok	34.8%	21.7%	28.3%
	GG	Count	6	6	12
		% within Kelompok	26.1%	26.1%	26.1%
	CG	Count	9	12	21
		% within Kelompok	39.1%	52.2%	45.7%
Total		Count	23	23	46
		% within Kelompok	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests tabel 3x2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.121 ^a	2	.571
Likelihood Ratio	1.129	2	.569
Linear-by-Linear Association	1.080	1	.299
N of Valid Cases	46		

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,00.

Chi-Square Tests tabel 3x2

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.121 ^a	2	.571
Likelihood Ratio	1.129	2	.569
Linear-by-Linear Association	1.080	1	.299
N of Valid Cases	46		

Risk Estimate

	Value
Odds Ratio for Alel (CC / GG) ^a	

a. Risk Estimate statistics cannot be computed. They are only computed for a 2*2 table without empty cells.

Crosstabulation MUTAN vs WT

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
MUTvsWT * Kelompok	46	53.5%	40	46.5%	86	100.0%

MUTvsWT * Kelompok Crosstabulation

			Kelompok		Total
			Hipospadia	Normal	
MUTvsWT	CC+CG	Count	17	17	34
		% within Kelompok	73.9%	73.9%	73.9%
	GG	Count	6	6	12
		% within Kelompok	26.1%	26.1%	26.1%
Total		Count	23	23	46
		% within Kelompok	100.0%	100.0%	100.0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.000 ^a	1	1.000		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.000	1	1.000		
Fisher's Exact Test				1.000	.631
Linear-by-Linear Association	.000	1	1.000		
N of Valid Cases	46				

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 6,00.

b. Computed only for a 2x2 table

Risk Estimate

	Value	95% Confidence Interval	
		Lower	Upper
Odds Ratio for MUTvsWT (CC+CG / GG)	1.000	.268	3.729
For cohort Kelompok = Hipospadia	1.000	.518	1.931
For cohort Kelompok = Normal	1.000	.518	1.931
N of Valid Cases	46		