

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **IV. 1 Ruang Lingkup Penelitian**

Bidang penelitian ini adalah genetika molekuler dan urologi.

#### **IV.2 Lokasi Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

Sampel DNA didapatkan dari tim Penyesuaian Kelamin (TPK) – RSUP.Dr.Kariadi (RSDK) - FK.UNDIP. Analisis DNA polimorfisme V89L menggunakan PCR-RFLP metode *PAGE* dan analisis mikrodelesi gen *AZF* dan *SRY* menggunakan PCR multipleks yang telah dikerjakan di CEBIOR Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang pada proyek penelitian sebelumnya.

#### **IV.3 Waktu Penelitian**

Penelitian dilaksanakan selama 9 bulan dari Juli 2014 sampai Maret 2015.

#### **IV.4 Desain Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif observasional dengan menggunakan pendekatan *cross sectional*.

## **IV.5 Populasi dan Sampel**

### **IV.5.1 Populasi**

Berdasarkan database pasien di CEBIOR dari tahun 2005 – 2014 terdapat 262 pasien hipospadia *isolated* yang didiagnosis oleh tim TPK RSDK-FK UNDIP. Sedangkan laki-laki dewasa normal yang tidak menderita hipospadia menjadi populasi untuk kontrol.

### **IV.5.2 Sampel**

Pemilihan sampel berdasarkan metode *consecutive sampling*. Sampel yang dipilih adalah pasien hipospadia *isolated* yang memiliki data sekunder hasil karyotipe dan mikrolelesi *AZF* dan *SRY* selama periode tahun 2010 – 2013. Sampel DNA laki-laki dewasa normal juga dimasukkan dalam penelitian sebagai kontrol normal.

#### **IV.5.2.1 Kriteria inklusi dan eksklusi sampel**

Kriteria Inklusi :

- a. Subjek yang secara klinis didiagnosis oleh tim TPK RSDK-FK UNDIP dengan *isolated hypospadias (IH)* yang orang tuanya menandatangani *informed consent*.
- b. Subjek yang datang selama periode tahun 2010-2013
- c. Terdapat data karyotipe dan data hasil pemeriksaan gen *AZF* dan *SRY*.
- d. Terdapatnya data klinis dan riwayat-riwayat lainnya yang tercantum dalam rekam medis yang telah dikerjakan oleh tim TPK RSDK-FK UNDIP.

Kriteria eksklusi sampel

- a. Subjek dengan sindromik hipospadia (memiliki gambaran klinis dan/atau dismorfologi lain selain hipospadia)
- b. Subjek dengan hipospadia *isolated* yang tidak memiliki data karyotipe dan data mikrodeselesi *AZF* dan *SRY*.

#### **IV.5.2.2** Kriteria inklusi dan eksklusi kontrol

##### Kriteria Inklusi:

- Pasien laki-laki dewasa baik sudah maupun belum memiliki anak dan tidak menderita hipospadia yang menandatangani *informed consent*.

##### Kriteria eksklusi:

- a. Memiliki riwayat sebelumnya dengan kelainan genitalia eksterna lain.
- b. Memiliki riwayat keluarga dengan kelainan hipospadia atau kelainan genitalia eksterna lainnya.

#### **IV.5.2.3** Cara pemilihan subjek

Subjek yang dipilih terdiri dari subjek kasus dan kontrol. Subjek kasus yang dipilih berdasarkan gambaran klinis hipospadia yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi sampel. Subjek laki-laki dewasa normal baik sudah maupun belum memiliki anak dilibatkan sebagai kontrol normal yang dipilih dari database DNA kontrol di CEBIOR.

#### **IV.5.2.4** Pemeriksaan Klinis

Data sekunder mengenai pedigree, karakteristik pasien (derajat/jenis hipospadia, usia saat datang) dan karakteristik pasien berupa riwayat obstetrik (usia ibu saat hamil,

BBLR, kehamilan kembar, persalinan prematur, primiparitas, dan penggunaan obat penguat kehamilan), riwayat paparan bahan kimia berbahaya (seperti pestisida, obat pembunuh serangga termasuk obat nyamuk; dan ayah perokok) didapat dari rekam medis pasien di CEBIOR-FK UNDIP.

#### IV.5.2.5 Pengumpulan Sampel

Sampel terdiri dari DNA pasien hipospadia dan kontrol laki-laki normal yang telah tersedia di CEBIOR-FK UNDIP melalui ekstraksi DNA dengan metode *salting out*.

#### IV.5.2.6 Besar Sampel

Perkiraan besar sampel dihitung menggunakan rumus besar sampel untuk *cross sectional* yaitu sebagai berikut:

$$N = \frac{z\alpha^2 (PQ)}{d^2} = \frac{(1,96)^2 \times (0,34 \times 0,66)}{(0,2)^2}$$

$Z\alpha$  = Tingkat kemaknaan

$P$  = *Minor Allel Frequency* SNP V89L gen *SRD5A2*<sup>60</sup>  
= 0,34

$Q$  = 1 -  $P$

$d$  = ketetapan absolut

Dari rumus diatas, minimal sampel adalah  $21,55 \approx 22$ .

Sampel pada penelitian ini adalah sebesar 46 sampel terdiri dari 23 sampel kasus hipospadia dan 23 sampel kontrol laki-laki normal.

## IV.6 Metode

### Metode Laboratorium

#### 1. Ekstraksi DNA

Sampel DNA tersedia di CEBIOR dan telah diekstraksi dengan metode “*salting out*” di CEBIOR-FK UNDIP Semarang.

#### 2. Kuantifikasi DNA

Kuantifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan Nanovue Plus GE Healthcare Bio Sciences AB (UK). Dengan konsentrasi DNA sekitar 100 ng/ul.

#### 3. Pemeriksaan V89L gen *SRD5A2*

##### A. PCR

Regio spesifik yang mengandung polimorfisme diamplifikasi menggunakan PCR. Sekuens primer yang digunakan adalah 5’- gca gcg gcc acc ggc gag g -3’ untuk *forward primer* and 5’ agc agg gca gtg cgc tgc act - 3’ untuk *reverse primer*.<sup>61</sup> Posisi primer dalam sekuens gen dapat dilihat pada lampiran. Reaksi PCR dan kondisi siklus termal dijelaskan dalam tabel berikut ini:

Reagen PCR	Konsentrasi
*Buffer (10x)	1X
DNTPs (2.5 mM)	0.1 mM
MgCl <sup>2</sup> (25mM)	1.5 mM

Primers (10 $\mu$ M)	0.4 mM
DMSO (100%)	10%
DNA	100 ng/ $\mu$ l
Amplitaaq polymerase ( <i>Applied Biosystem</i> )	1 unit
<b>Volume Final</b>	25
	94°C – 10 min
	94°C – 1 min
Kondisi siklus	58°C – 1 min } 35X
	72°C – 1 min }
	72°C – 10 min
Besar produk PCR	330 bp

---

Setelah melalui tahap PCR, produk PCR dijalankan pada 0,8% gel agarose untuk mengidentifikasi produk PCR dengan besar produk 330 bp.

#### B. RFLP

Enzim restriksi yang digunakan adalah *RsaI* yang memotong di *recognition site* GT<sup>^</sup>AC. Campuran enzim restriksi kemudian dibuat dalam total volume 10 $\mu$ l (sudah termasuk didalamnya 1 unit enzim, 1Xbuffer dan sisanya air distilasi).<sup>61</sup> Campuran tersebut kemudian ditambahkan dengan 10 $\mu$ l produk PCR dan diinkubasi dalam suhu 37°C selama kurang lebih 1,5

jam. Produk yang telah dicerna dengan enzim *RSaI* kemudian dijalankan pada 10% gel poliacrilamide.

#### C. *Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE)*

Secara ringkas *PAGE* dibuat dalam konsentrasi 10% termasuk didalamnya acrilamide, TBE buffer 0,5X, temed, dan ammonium persulfat (APS). Campuran larutan dimasukan dengan menggunakan pipet kedalam dua susun kaca yang dijepit di rak penyangga dan ditunggu hingga larutan beku. Setelah sampel dimasukan dalam tiap sumur, gel dijalankan pada TBE buffer 0,5X dengan voltase 100 volt selama 1 jam. Pengecatan silver dilakukan setelahnya.<sup>62,63</sup>

#### D. Hasil Genotip

Setelah dilakukan *silver staining* (Pengecatan silver) dapat dilihat fragmen pita yang berbeda untuk masing-masing alel. Fragmen pita untuk genotip VV adalah 169 bp, 105 bp, 64 bp, dan 19 bp (tak akan terlihat); untuk genotip VL adalah 169 bp, 105 bp, 83 bp, 64 bp dan 169bp, 105bp, 83bp untuk genotip LL.<sup>61</sup>

#### E. Sekuensing

Sekuensing selanjutnya dilakukan untuk konfirmasi hasil genotip.

#### 4. Pemeriksaan Gen AZF dan SRY

Diagnosis molekuler gen *AZF* dan *SRY* telah dikerjakan di laboratorium CEBIOR dengan menggunakan teknik PCR multipleks<sup>57</sup> pada penelitian

sebelumnya. Langkah pemeriksaan gen *AZF* dan *SRY* seperti pada panduan pemeriksaan mikrodlesi kromosom Y.<sup>57,63,64</sup>

#### **IV.7 Variabel**

##### **Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah *isolated hypospadi*

##### **Variabel Terikat**

1. Frekuensi alel dan genotip polimorfisme gen *SRD5A2* V89L pada pasien *isolated hypospadi*

Skala: Nominal

2. Mikrodlesi gen *AZF* (regio *AZF<sub>a</sub>*, *AZF<sub>b</sub>*, *AZF<sub>c</sub>*) dan *SRY*

Skala : Nominal

#### **IV.8 Definisi Operasional**

1. *Isolated hypospadi* : suatu kelainan muara uretra pada bayi laki-laki dimana posisi ostium uretra eksternum berada di sisi anterior, pertengahan, atau di posterior tanpa disertai kelainan lain di traktus reproduksi maupun di luar traktus reproduksi.
2. Polimorfisme *SRD5A2* V89L : suatu polimorfisme umum pada gen *SRD5A2* dimana terjadi perubahan basa G menjadi C pada nukleotida 265 yang menyebabkan perubahan asam amino valin (V) menjadi leusin (L) di kodon 89. Perubahan ini dapat dilihat dengan pemeriksaan PCR-RFLP yang

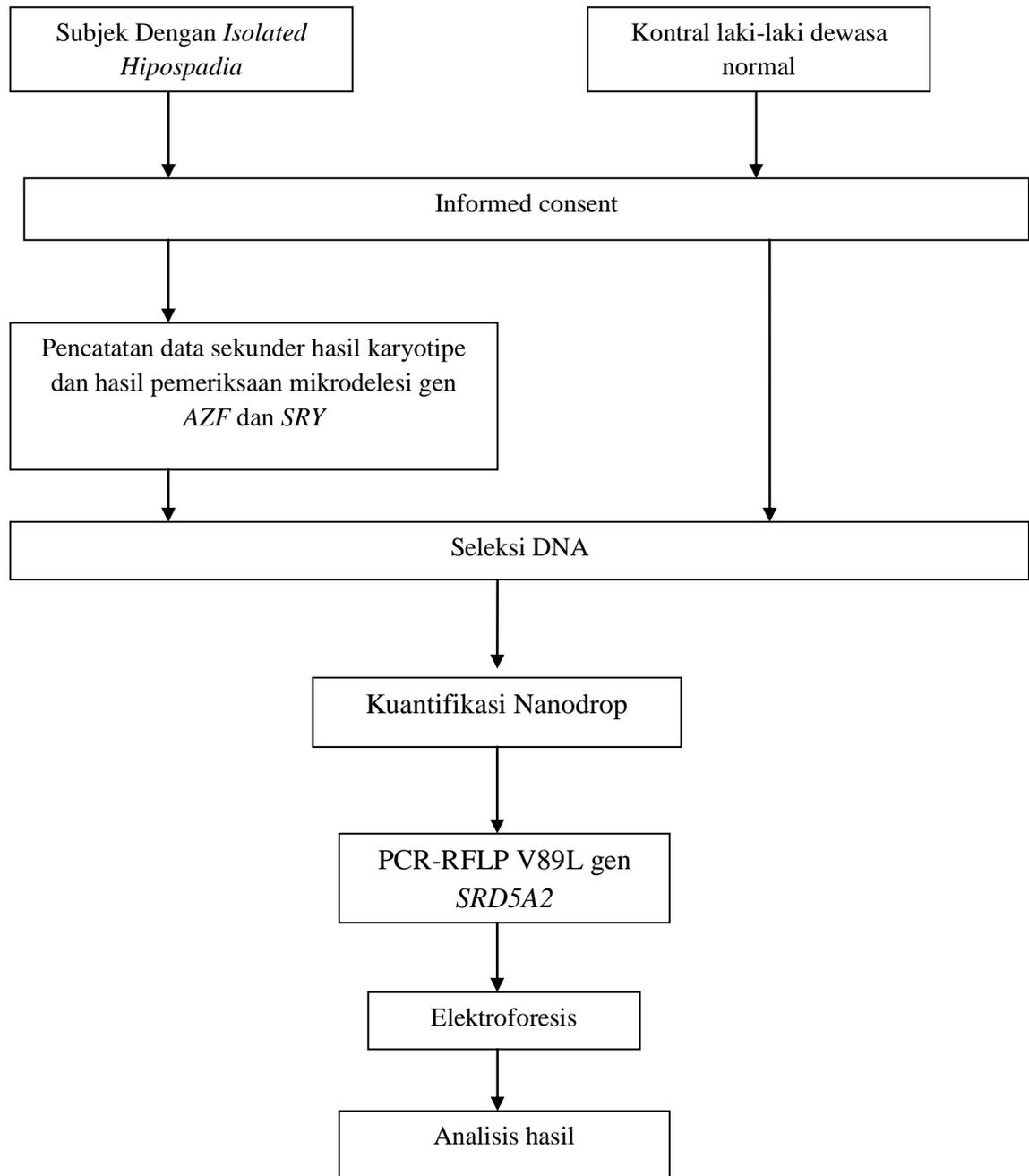
memperlihatkan genotip homozigot VV/GG (dengan fragmen pita 169 bp, 105 bp, 64 bp, dan 19 bp), heterozigot VL/GC (dengan fragmen pita 169 bp, 105 bp, 83 bp, 64 bp), dan homozigot LL/CC (dengan fragmen pita 169bp, 105bp, 83bp).

3. Mikrodelesi regio gen *AZFa* : diketahui dengan tidak munculnya pita berukuran 320 bp dan atau 326 bp pada gel agarosa.
4. Mikrodelesi regio gen *AZFb* : diketahui dengan tidak munculnya pita berukuran 274 bp dan atau 301 bp pada gel agarosa.
5. Mikrodelesi regio gen *AZFc* : diketahui dengan tidak munculnya pita berukuran 400 bp dan atau 126 bp pada gel agarosa.
6. Mikrodelesi gen *SRY* : diketahui dengan tidak munculnya pita berukuran 472 bp pada gel agarosa.

#### **IV.9 Pengolahan dan Analisis Data**

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan SPSS 17 for windows. Data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel. Kesimpulan diambil melalui interpretasi dan analisis hasil yang didapat. Data karakteristik pasien, data hasil pemeriksaan polimorfisme V89L gen *SRD5A2* pada kasus dan kontrol yang akan dianalisis lebih lanjut dengan *chi-square test* untuk mendapatkan *Prevalence ratio* (PR), serta data hasil pemeriksaan gen AZF dan SRY.

#### IV.10 Alur Penelitian



---

<sup>60</sup> NCBI. dbSNP short genetic variation. refSNP rs523349. [cited 2014 April 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<sup>61</sup> Vokwana CKJ. Mapping gene variation in Sub-Saharan African populations. [Dissertation of Faculty of Health Sciences]. University of Witwatersrand, Johannesburg. 2008. [Cited 2014 January 7]. Available from: <http://wiredspace.wits.ac.za/handle/10539/6892>

<sup>62</sup> Bio-rad. A Guide to polyacrilamide gel electrophoresis and detection. <http://www.bio-rad.com/>

<sup>63</sup> Faradz SMH. Pengantar sitogenetika, genetika molekuler dan alat bantu konseling genetika. Laboratorium Bioteknologi Kedokteran FK UNDIP. 2000

<sup>64</sup> Sunarno JM. Distribusi gen *Azoospermia Factor* (AZF) pada pasien dengan hipospadia. Tesis. 2009. Available at : <http://eprint.undip.co.id>.