

BAB VI

PEMBAHASAN

VI. 1. DISKUSI

A Hubungan polimorfisme V89L dengan Hipospadia

Polimorfisme pada gen *SRD5A2* menunjukkan hasil yang berbeda-beda tiap ras.¹⁵ Polimorfisme V89L merupakan polimorfisme yang banyak dikaitkan dengan kelainan hormonal yang menyebabkan ambiguous genitalia termasuk hipospadia.⁹⁻¹¹ Polimorfisme pada nukleotida 265 gen *SRD5A2* memperlihatkan 2 alel yaitu G dan C dimana keberadaan alel C dikaitkan dengan peningkatan risiko hipospadia pada populasi India, China, Jepang.^{7,12,13} Homozigot CC (LL) dikatakan menurunkan aktivitas enzim 5 α -reductase hampir sebesar 30% sehingga menurunkan konsentrasi dehidrotestosteron dalam perkembangan genitalia eksterna laki-laki.¹⁴

Pada penelitian ini didapatkan PR (alel mutan/alel *wildtype*) adalah 1 ; 95% CI : 0.268-3.729 dengan nilai p tidak signifikan (=1.0). PR ini menunjukkan bahwa belum dapat disimpulkan apakah alel C meningkatkan risiko hipospadia atau tidak. Frekuensi alel C pada keseluruhan sampel sedikit lebih tinggi dibanding alel G (0,51 dan 0,49, secara berturut-turut). Alel C pada sampel hipospadia juga lebih banyak ditemukan dibanding pada kontrol (0,26 dan 0,24, secara berturut-turut). Penelitian di Belanda dengan sampel 620 kasus hipospadia dan 596 kontrol menunjukkan OR alel CC : 1.0 (ref), OR alel CG : 1.0 , 95% CI (0.8-1.3), OR alel GG: 1.1, 95% CI (0.7-1.6).⁹ Sama seperti di Belanda, penelitian ini tidak dapat menunjukkan hubungan positif antara alel C dengan peningkatan risiko hipospadia.

Sedangkan studi di India tentang polimorfisme V89L memperlihatkan hasil yang berbeda secara signifikan antara kasus dan kontrol OR genotip VL: 3.01, 95% CI:1.87– 4.8, $p = 0.00$; OR genotip LL : 1.9, 95% CI:1.05–3.4, $p = 0.03$; OR genotip VL+ LL: 2.57, 95% CI:1.79 –3.68, $p = 0.000$).¹² Studi di Jepang menunjukkan bahwa risiko hipospadia berat ditemukan pada anak yang memiliki alel C pada nucleotida 265 (p.89L), dengan OR genotip GC: 3.16, 95% CI: 1.05–9.50, OR genotip CC: 3.29, 95% CI: 0.95–11.47 [kecenderungan nilai P: 0.057], OR genotip (GC+CC): 3.19, 95% CI: 1.09–9.36.¹³

Penelitian ini tidak dapat mereplikasi penelitian lain yang menunjukkan hasil positif dikarenakan perbedaan etnis mempengaruhi polimorfisme dan juga jumlah sampel yang terlalu kecil untuk suatu studi polimorfisme pada studi ini. Meskipun demikian penelitian ini adalah studi awal yang mengidentifikasi SNP V89L gen *SRD5A2* pada pasien hipospadia *isolated* di Indonesia. Penelitian lanjutan dengan jumlah sampel yang lebih besar perlu dilakukan.

B. Hubungan polimorfisme V89L dengan penyakit lain

Selain dengan hipospadia, polimorfisme V89L juga dikaitkan dengan beberapa penyakit lain seperti kanker prostat dan androgenetik alopesia.^{15,61} Kaitannya dengan kanker prostat dikarenakan dampak alel L yang berkebalikan dengan hipospadia dimana alel leusin dianggap menurunkan risiko terjadinya penyakit sedangkan alel valin meningkatkan risiko penyakit.^{15,61} Alel L ini banyak dijumpai pada populasi Asia dan dianggap menjelaskan rendahnya risiko kanker prostat pada populasi ini.^{14,15,61} Polimorfisme V89L pada populasi Mesir dengan

androgenetik alopesia memperlihatkan OR yang signifikan (3.7). Alel L memiliki risiko lebih tinggi terjadinya stress oksidatif pada kasus androgenetik alopesia.⁶⁵

C. PCR-RFLP dengan visualisasi PAGE (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) untuk mendeteksi polimorfisme V89L gen *SRD5A2*

Studi-studi sebelumnya tentang V89L menggunakan metode PCR-RFLP dimana enzim restriksi *RsaI* digunakan untuk mencerna produk PCR sehingga menghasilkan fragmen-fragmen pita yang menunjukkan genotip masing-masing alel.^{61,65} Demikian pula dengan penelitian ini metode yang digunakan sama seperti pada metode sebelumnya.⁶¹ Pada penelitian ini telah dicoba menggunakan gel elektroforesis agarose untuk visualisasi produk RFLP seperti penelitian sebelumnya, namun ternyata pita ukuran <100bp tidak nampak dan separasi pita tidak jelas. Oleh karena itu, peneliti beralih menggunakan gel poliacrilamide (PAGE) sehingga membuat penelitian ini berbeda dari sebelumnya. Keunggulan dari menggunakan PAGE adalah pita dapat terlihat lebih jelas terpisah, gel stabil secara kimia, separasi baik untuk fragmen molekul kecil, lebih aman karena tidak menggunakan pewarna ethidium bromide (karsinogenik).^{66,67} PAGE merupakan metode lama yang sudah banyak ditinggalkan dikarenakan memerlukan persiapan yang lebih rumit dalam membuat gel (yang juga menjadi kelemahan dari metode PAGE).⁶⁷ Namun dibanding kerumitannya, PAGE dapat dipertimbangkan dilakukan bila dengan metode gel elektroforesis gagal. Pada penelitian ini hasil RFLP dengan metode PAGE selanjutnya dikonfirmasi dengan sekuensing pada semua sampel. Hasil genotip metode RFLP dengan PAGE sesuai dengan hasil sekuensing.

D. Karakteristik pasien hipospadia *isolated* di Indonesia

Karakteristik pasien pada penelitian ini dilihat dari fenotipe/ jenis hipospadia, rata-rata usia datang ke CEBIOR, dan data karakteristik riwayat faktor risiko yang menonjol.

Distribusi fenotip hipospadia terbanyak dari penelitian ini adalah penile hipospadia (46%) diikuti penoscrotal (38%), scrotal (8%), coronal (4%) dan penile dengan 2 OUE (4%). Sedikit berbeda dengan penelitian di India dimana frekuensi distribusi yang dominan adalah fenotip berat (penoscrotal dan scrotal) yaitu sebesar 56,38%.¹² Studi di Jepang dengan 89 kasus hipospadia, 63% memiliki fenotip ringan sisanya fenotip berat (33%).¹³ Sedangkan studi di Belanda dengan 305 kasus hipospadia menunjukkan hipospadia distal yang dominan (67%) diikuti hipospadia pertengahan dan proksimal, 22% dan 14% berturut-turut.³ Pada penelitian ini fenotipe hipospadia penile tampak paling dominan tidak seperti pada penelitian di India¹² dimana fenotip hipospadia berat lebih dominan. Hal ini kemungkinan karena metode sampling yang dilakukan bergantung pada ketersediaan data mikrodlesi *AZF* dan *SRY*. Sehingga tidak dapat mencerminkan distribusi fenotip secara objektif. Selain itu karena pasien hipospadia berat biasanya disertai kelainan lain sehingga tergolong dalam hipospadia sindromik *disorder* atau DSD (*Disorder of Sex Development*) dan harus dieksklusi pada penelitian ini.

Fenotip yang bervariasi ini dipengaruhi faktor genetik dan juga lingkungan. Tipe hipospadia anterior dan tengah dipercaya terkait dengan faktor genetik,

sedangkan tipe posterior lebih terkait dengan faktor risiko kehamilan seperti primiparitas, persalinan prematur, dan kecil usia kehamilan.⁶⁸

Pasien hipospadia yang datang ke CEBIOR memiliki usia rata-rata 7 tahun 2 bulan. Kedatangan mereka berkaitan dengan keinginan orang tua untuk dilakukan operasi. Pemeriksaan kromosom maupun gen dilakukan sebelum dilakukan prosedur operasi. Usia datang yang terlambat ini serupa dengan penelitian di Pakistan, dimana rata-rata usia datang disana adalah 8.12 ± 5.04 SD.⁶⁹ Sebanyak 1.87% pasien dioperasi pada usia 1-2 tahun, 34.6% dioperasi pada usia 3-5 tahun dan sisanya pada usia ≥ 6 tahun. Alasan tingginya rasio pasien yang datang diatas usia 6 tahun adalah karena rendahnya kesadaran masyarakat tentang kondisi hipospadia dan karena alasan keuangan.⁶⁹ Hal ini berkebalikan dengan waktu ideal operasi *repair* hipospadia yaitu disekitar usia 6-12 bulan, namun bila tidak memungkinkan kesempatan lain adalah saat usia 3-4 tahun.⁷⁰

Dari temuan data sekunder karakteristik bahwa 78% anak hipospadia lahir dari ibu primipara. Belum ada penelitian yang menjelaskan bagaimana primipara bisa berkaitan dengan hipospadia. Hanya terdapat 1 penelitian yang menyebutkan asosiasi positif antara kehamilan pertama dengan hipospadia dengan frekuensi kejadian 1.9% dibanding kehamilan lain (0.9%) dan perbedaan tersebut signifikan secara statistic ($p < .001$).³⁵ Belum jelas bagaimana mekanisme hubungan ini terjadi. Namun, alasan yang mungkin adalah saat primipara ibu belum mempersiapkan kehamilan dengan baik, asupan nutrisi yang kurang terjaga, maupun paparan risiko zat berbahaya yang belum diketahui sehingga tidak memiliki kesempatan

menghindari. Sedangkan ibu multipara memiliki pengetahuan dan pengalaman yang lebih banyak dari kehamilan sebelumnya.

E. Mikrodelesi *AZF* dan *SRY*

Pada penelitian ini sengaja memasukan data sekunder berupa hasil pemeriksaan mikrodelesi gen *AZF* dan *SRY* yang telah dikerjakan pada proyek penelitian sebelumnya dengan tujuan bahwa data hasil mikrodelesi dapat digunakan sebagai penunjang dalam konseling genetik akan risiko terjadinya infertilitas pada sampel pasien hipospadia.

Terdapat 2 pasien hipospadia pada penelitian ini yang memiliki mikrodelesi *AZF α* , sisanya tidak memiliki mikrodelesi pada *AZF* maupun *SRY*. Dua pasien tersebut memiliki mikrodelesi parsial *AZF α* (besar produk 326bp pada set primer sY84) dengan klinis hipospadia penile dan penoscrotal. Keduanya memiliki alel heterozigot (CG) pada SNP V89L. Delesi komplit pada *AZF α* selalu dikaitkan dengan SCOS (*sertoli cell only syndrome*), suatu kondisi yang langka dimana kurang dari 5% dari delesi *AZF* yang dilaporkan.^{44,45} *AZF α* tersusun dari 2 gen yang mengkode protein, *USP9Y* dan *DBY*. Delesi komplit *AZF α* terkait dengan azoospermia dan tidak terdapat spermatozoa testicular, sedangkan laki-laki dengan delesi parsial *AZF α* (*USP9Y* saja/*DBY* saja) sering memperlihatkan adanya sperma dalam ejakulat walaupun dengan konsentrasi sperma 0.1 jt/ml atau lebih sedikit (cryptozoospermia).⁷¹

Tidak ada hubungan langsung antara polimorfisme V89L gen *SRD5A2* dengan mikrodelesi *AZF* maupun *SRY*. Namun pada penelitian ini ketiga gen tersebut

sengaja menjadi variabel dikarenakan dua tujuan yang berbeda. Pertama untuk mengetahui hubungan polimorfisme dengan risiko terjadinya hipospadia dan kedua untuk memprediksi risiko infertilitas pada pasien hipospadia *isolated* sehingga bisa menjadi dasar untuk konseling genetik.

Delesi pada regio *AZF* terjadi dengan frekuensi yang berbeda-beda. Berdasarkan pengalaman *Institute of Reproductive Medicine* di Munster, dari 34 pasien dengan delesi kromosom Y, delesi regio *AZFc* adalah yang terbanyak (79%) diikuti *AZFc* (9%), *AZFbc* (6%), *AZFa* (3%) dan *AZFabc* ("XX male": 3%).⁵⁷

Temuan 8,7% sampel hipospadia dengan mikrodelesi *AZFa* menjadi dasar informasi bahwa pasien mungkin dapat mengalami masalah infertilitas di kemudian hari. Oleh sebab itu, bila pasien cukup dewasa, disarankan dilakukan pemeriksaan hitung jumlah sperma untuk membuktikan ada tidaknya masalah dalam spermatogenesis. Konseling genetik pada pasien ini perlu dilakukan mengingat risiko infertilitas yang mungkin mereka hadapi.

Perlu diketahui bahwa pasien-pasien dengan azoospermia atau oligospermia berat yang mungkin menjadi kandidat ICSI atau TESE/ICSI harus ditawarkan skrining pemeriksaan ini karena TESE tidak boleh ditawarkan pada kasus delesi komplit *AZFa*, delesi komplit *AZFc* atau delesi regio *AZFc*. Selain itu, mikrodelesi *AZFc* diturunkan ke anak laki-laki bila teknik reproduksi terbantu (ART) dikerjakan. Oleh karena itu, diagnosis delesi adalah suatu nilai prognostik dan dapat mempengaruhi pilihan terapi.⁵⁷

F. Konseling genetik pada pasien hipospadia *isolated*

Beberapa informasi yang perlu diperoleh orang tua bayi antara lain kepastian jenis kelamin anaknya (perlu dilakukan karyotiping), jenis kelainan yang dialami anaknya (dalam hal ini adalah kelainan muara kencing yang tidak normal), penyebab terjadinya kelainan tersebut dan faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi. Konseling pada ibu-ibu primipara perlu ditekankan mengingat temuan 78% kasus hipospadia pada penelitian ini lahir dari ibu-ibu primipara dan informasi tentang faktor risiko yang bisa dihindari penting untuk diinformasikan.

Konseling genetik yang lebih seksama perlu diberikan pada pasien hipospadia yang memiliki data mikrodelesi *AZFa*. Perlu diinformasikan mengenai insiden mikrodelesi ini dan kemungkinan risiko infertilitas yang dapat dialami. Pemeriksaan sperma setelah pasien dewasa dapat dilakukan untuk membuktikan apakah azoospermia atau oligospermia dialami oleh pasien.

Yang penting dalam konseling genetik adalah bahwa kelainan ini merupakan suatu kondisi dimana faktor genetik, lingkungan, dan epigenetik berperan dalam timbulnya penyakit. Pencegahan dengan menghindari faktor risiko adalah salah satu langkah yang dapat dilakukan untuk mengurangi insiden.

VI.2 KETERBATASAN PENELITIAN

Ada beberapa keterbatasan penelitian ini. Yang pertama dan utama adalah jumlah sampel yang terlalu kecil untuk suatu studi polimorfisme. Meski demikian, studi ini adalah suatu studi awal yang meneliti polimorfisme V89L gen *SRD5A2*

pada pasien hipospadia di Indonesia. Studi lanjutan dengan sampel yang lebih besar perlu dilakukan. Pemilihan sampel hipospadia pada penelitian ini juga bergantung pada ketersediaan data mikrodelsi *AZF* dan *SRY*. Hal tersebut menyebabkan seleksi sampel menjadi lebih ketat dan sampel menjadi lebih sedikit.

-
- ⁶⁵ Roshdy OH, Mohammad NS, Kamha ES, Omar M. Genetic analysis of 5 α -reductase type II enzyme in relation to oxidative stress in cases of *Androgenetic alopecia* in a sample of Egyptian population. *Our Dermatol Online*.2013;4(4):468-474
- ⁶⁶ Barril P, Nates S. Introduction to agarose and polyacrilamide gel electrophoresis matrices with respect to their detection sensitivities. Institute de virologia “Dr. J.M.Vanella”. Argentina. Available at : <http://www.intechopen.com>. [cited March 31th, 2015].
- ⁶⁷ Anonimous. Safer Alternatives to Ethidium bromide. Risk Management Services environmental services. Available at:<http://www.riskmanagement.ubc.ca/environment>.
- ⁶⁸ Van Rooij I.A.L.M, van der Zanden L.F.M, Brouwers M.M, Knoers N.V.A.M, Feitz W.F.J, Roelevend N. Risk factors for different phenotypes of hypospadias: results from a Dutch case-control study. *BJU International*. 2013;112:121-128.
- ⁶⁹ Khan M, Majeed A, Hayat W, Ullah H, Naz S, Shah SA, et al. Hypospadias Repair : A single centre experience. *Plastic Surgery International*. 2014:1-7
- ⁷⁰ Manzoni G, Bracka A, Palminteri E, Marriocco G. Hypospadias surgery: when, what, and by whom?. *BJU international*. 2004;94(8):1188-1195
- ⁷¹ Ferlin A, Arredi B, Speltra E, Cazzadore C, Selice R, Garolla A, et al. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: a 10-year experience in Italy. 2007;92(3):762-770.