

ARTIKEL

by Evi Hanizar.

Submission date: 30-Jul-2019 11:03PM (UTC-0500)

Submission ID: 1156409195

File name: Naskah-Hayati.pdf (418.64K)

Word count: 1998

Character count: 12797

Analysis of AZF Gene Deletion on Infertile Men with Azoospermia - Oligoasthenoteratozoospermia (OAT)

Evi Hanizar¹⁾, Aucky Hinting²⁾

¹⁾ Department of Biology- Faculty of Mathematics and Science Education IKIP PGRI Jember

²⁾ Faculty of Medicine – Airlangga University, East Java, Indonesia

ABSTRACT

Genetic screening on infertile men from many countries showed that they had deletions in the AZF region. The aim of research was to get prevalence of AZF gene deletion on male infertility with sperm abnormality and to get the type of correlation between the deletion and each of groups sperm abnormality. Analisis of deletion was conducted by amplification of the DNA with PCR (Polymerase Chain Reaction) method used seven (7) AZF gene location sY84, sY86 (subregion AZFa), sY127, sY134 and RBM/E355 (subregion AZFb), and DAZ/sY254, sY255 (subregion AZFc). Amplification results of each genes were sequenced and fixed with the same gene from NCBI ((National Center of Biotechnology Information), to get the percentage of homology. Deletion of AZF gene different among of each sperm category ($p < 0.05$) Prevalence of deletion in azoospermic group was higher than prevalence of other groups. Based on seven genes that was analysed, the highest prevalence of gene deletion was sY86 gene, on the other hand the most rarely deletion gene was DAZ/sY255 gene. The correlation of AZF genes deletion and each of sperm abnormality categories can't be determined only from these AZF genes yet. Deletion that involved many AZF genes correlated with so lower the quantity and quality of sperm.

Key Words : male infertility, azoospermic factor, gene deletion, sperm abnormality

PENGANTAR

Infertilitas pria merupakan penyebab 40 % dari 10-15 % pasangan infertil, yang meliputi kuantitas dan kualitas spermatozoa (Siffroi *et al.*, 2000). Proses pembentukan spermatozoa (spermatogenesis) dikendalikan oleh gen-gen yang terdapat dalam lengan panjang kromosom Y (Yq), dalam region yang dikenal sebagai region AZF (Azoospermic Factor). Region ini terbagi atas tiga subregion yaitu yaitu AZFa, AZFb dan AZFc (CMGS, 2000; Naysmith *et al.*, 2000; el *et al.*, 2001, Ferlin *et al.*, 2003). dan diturunkan hanya dari ayah ke anak laki-laki (Oquando & McGill, 2003).

Kajian genetik pada pria infertil yang mempunyai spermatozoa dibawah standar normal (*severe oligozoospermia dan azoospermia*), menunjukkan ada delesi pada salah satu atau lebih gen dalam subregion AZF (Moro *et al.*, 2000; Foresta *et al.*, 2001; Dohle *et al.*, 2002; Ferlin *et al.*, 2003). Namun demikian, hubungan antara kejadian delesi dengan abnormalitas jumlah spermatozoa belum jelas. Kihaila *et al.*, (2005) menemukan adanya delesi yang melibatkan ketiga subregion AZFa,b dan c sekaligus.

Di Indonesia, kajian genetik terhadap pria infertil belum menjadi prosedur rutin di

klinik infertilitas, padahal jumlah kasus infertilitas pria idiopatik (kemungkinan disebabkan faktor genetik) di beberapa klinik infertilitas semakin meningkat. Hasil penelitian Evi Hanizar (2003) tentang delesi gen RBM (terdapat dalam subregion AZFb) dan DAZ (terdapat dalam subregion AZFc) pada pria infertil, menunjukkan 34,55 % delesi terjadi pada kelompok azoospermia dan 23,63 % delesi pada kelompok oligozoospermia (jumlah spermatozoa \leq 20 juta /ml ejakulat) hingga *severe* oligozoospermia (jumlah spermatozoa \leq 5 juta /ml ejakulat). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan prevalensi terjadinya delesi pada masing-masing kategori abnormalitas spermatozoa dan hubungan antara delesi dengan kuantitas dan kualitas spermatozoa yang dihasilkan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Sampel yang datang secara sukarela ke klinik infertilitas dengan kriteria Infertil primer, artinya belum pernah berhasil menghamili pasangannya minimal dua tahun setelah *intercourse* tanpa menggunakan pelindung, dilakukan analisis spermatozoa yang meliputi jumlah, motilitas dan morfologi spermatozoa sesuai standar WHO tahun 1992.

Penghitungan Jumlah Spermatozoa

Jumlah spermatozoa dihitung dengan menggunakan kamar hitung dari Markler, dan dikategorikan normal jika minimal mempunyai 20 juta/ml ejakulat. Motilitas spermatozoa diperiksa dan dihitung dengan pembesaran 400-600 kali di bawah mikroskop cahaya. Klasifikasi motilitas

adalah spermatozoa bergerak cepat dan lurus ke muka (a), spermatozoa bergerak lambat atau sulit maju lurus (b), spermatozoa tidak bergerak maju (c), spermatozoa tidak bergerak (d). Motilitas spermatozoa dikatakan baik jika minimal 50 % spermatozoa bergerak maju (kategori a dan b). Morfologi spermatozoa diperiksa dan dihitung setelah dibuat preparat hapusan pada kaca obyek, dan pengecatan dengan kristal violet. Pemeriksaan morfologi dilakukan dibawah mikroskop dengan *oil immersion* dengan pembesaran 1000 kali. Spermatozoa normal yaitu spermatozoa dengan kepala berbentuk oval, leher baik dan ekor lurus. Spermatozoa dikatakan berkualitas morfologi baik jika $>$ 15 % spermatozoa mempunyai bentuk normal.

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi dari darah perifer dengan menggunakan kit untuk ekstraksi DNA. Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV. DNA selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan metode PCR dalam *Thermal - cycler*, dengan total volume 25 μ l yang terdiri dari PCR *mix* (terdiri dari PCR *buffer*, *Taq polymerase*, dNTP dan $MgCl_2$) sebanyak 12,5 μ l dimasukkan, satu pasang primer masing-masing 2,5 μ l, sampel DNA dan *RNA-ase free water* steril. Amplifikasi ini dilakukan satu persatu untuk masing-masing primer gen yang akan dianalisis, dengan kondisi amplifikasi yang sudah dioptimasi dan berat molekul (dalam ukuran bp = *base-pairs*) yang dihasilkan seperti dalam tabel 1 .

Tabel 1. Kondisi amplifikasi masing-masing Primer

Primer	Pre-heat	Denaturasi	Annealing	Elongasi	Extensi	bp
SRY	95°C-5'	94°C-1'	57°C-1'	72°C-1'	72°C-10'	472
sY84	95°C-5'	95°C-45"	54°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	320
sY86	95°C-5'	95°C-45"	55°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	326
sY127	95°C-5'	95°C-45"	50°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	274
sY134	95°C-5'	95°C-45"	50°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	301
E355	95°C-5'	95°C-45"	51°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	550
sY254	95°C-5'	95°C-45"	61°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	400
sY255	95°C-5'	95°C-45"	51°C-45"	72°C-45"	72°C-10'	126

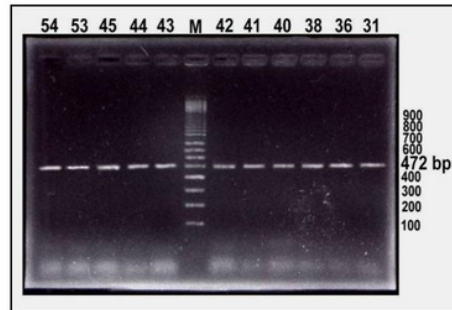
Hasil PCR divisualisasi melalui elektroforesis dengan 2 % agarose gel dalam TBE 0,5 x pada *electroforesis chamber*, *staining* dengan ethidium bromide dan diamati dengan *transiluminator*.

Semua sampel yang akan digunakan untuk analisis delesi gen dalam region AZF harus diseleksi dahulu dengan gen SRY sebagai kontrol adanya faktor testis. Amplifikasi DNA dengan primer gen tersebut mempunyai berat molekul 472 bp. Sampel yang tidak dapat mengamplifikasi gen tersebut tidak digunakan untuk analisis gen region AZF. Selanjutnya, hasil amplifikasisampel-sampel DNA dengan masing-masing primer gen dalam subregion AZF yang menghasilkan berat molekul sesuai ukuran yang dimaksud menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung sekuen DNA gen yang dianalisis. Sebaliknya apabila tidak mengamplifikasi ukuran yang diharapkan setelah tiga kali perlakuan PCR, berarti sampel tersebut mengalami delesi untuk sequens DNA tersebut. Hasil PCR dari masing-masing lokasi gen selanjutnya di sekuensing di Lembaga Eijkman Jakarta dan Balai Pengkajian Bioteknologi Tangerang

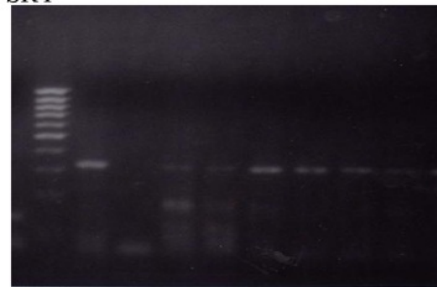
HASIL

Visualisasi hasil PCR untuk gen SRY sebagai kontrol adanya faktor testis nampak pada Gambar 1. Sedangkan visualisasi hasil PCR untuk gen sY84, dan RBM/E355 nampak pada Gambar 2 dan 3. Dari Gambar 2 nampak bahwa sampel nomor 59 mengalami delesi untuk gen sY84 karena tidak mampu

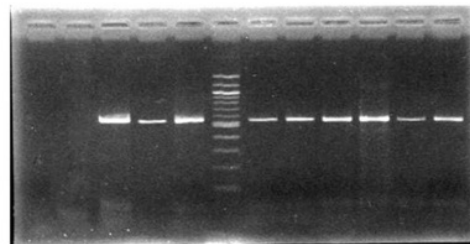
mengamplifikasi DNA sesuai target, sementara pada Gambar 3 nampak sampel nomor 1 dan 2 mengalami delesi untuk gen E355.



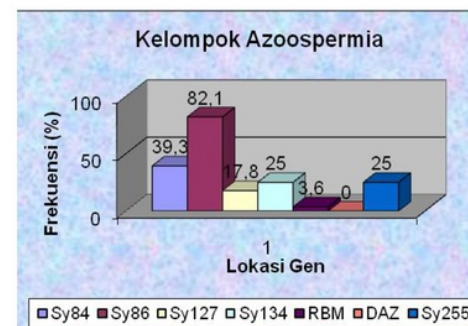
Gambar 1. Visualisasi hasil PCR untuk gen SRY



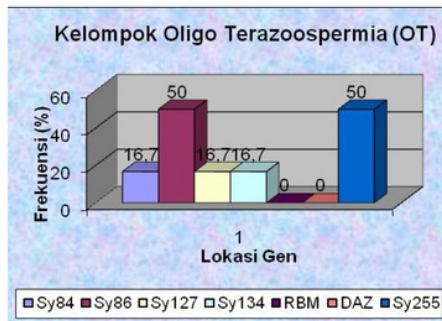
Gambar 2. Visualisasi Hasil PCR untuk Gen sY84



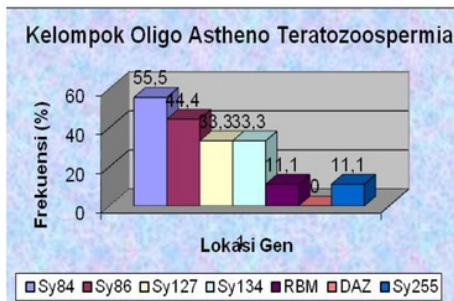
Gambar 3. Visualisasi Hasil PCR untuk Gen E355



Gambar 4. Prevalensi Delesi Gen pada Kelompok Azoospermia



Gambar 5. Prevalensi Delesi Gen pada Kelompok Oligoteratozoospermia



Gambar 6. Prevalensi Delesi Gen pada Kelompok Oligoastheno teratozoospermia

Hasil analisis delesi gen menunjukkan bahwa delesi gen dalam subregion AZFa, AZFb dan AZFc terjadi pada semua kategori spermatozoa mulai oligoteratozoospermia hingga azoospermia (Gambar 4-6). Kejadian ini menunjukkan bahwa delesi gen dalam subregion AZF tidak hanya berpengaruh terhadap jumlah spermatozoa saja tetapi juga motilitas dan morfologi spermatozoa.

Namun demikian, berdasarkan tiga indikator spermatozoa yaitu jumlah, motilitas dan morfologi, delesi region AZF cenderung berpengaruh terhadap jumlah dan morfologi spermatozoa. Hal ini dapat dilihat dari data yang tidak menunjukkan adanya delesi pada kategori oligoasthenozoospermia atau asthenozoospermia.

Kategori Oligoasthenozoospermia, memiliki jumlah spermatozoa 5 – 20 juta per ejakulat, motilitas spermatozoa yang bergerak maju dan lurus < 50 % sedangkan morfologi normal > 15 %. Khusus kategori asthenozoospermia apabila hanya memiliki

motilitas spermatozoa yang bergerak maju dan lurus < 50 % sedangkan jumlah dan morfologinya normal.

PEMBAHASAN

Berdasarkan tiga indikator spermatozoa yaitu jumlah, motilitas dan morfologi, delesi region AZF cenderung berpengaruh terhadap jumlah dan morfologi spermatozoa. Kondisi demikian sesuai dengan hasil penelitian Sudjarwo (2001), yang menunjukkan bahwa motilitas spermatozoa dipengaruhi oleh adanya mutasi DNA mitokondria (mtDNA) dari spermatozoa. Delesi yang terjadi pada kelompok Oligoastheno teratozoospermia lebih disebabkan oleh adanya morfologi yang tidak normal cenderung mengakibatkan motilitas yang tidak normal juga

Ditinjau dari terjadinya delesi gen dari masing-masing subregion AZF pada masing-masing kategori spermatozoa menunjukkan adanya perbedaan kejadian delesi pada masing-masing kategori ($p < 0.05$). Hal ini nampak dari data bahwa prevalensi delesi pada kategori azoospermia lebih banyak dibanding prevalensi pada kategori yang lain. Secara berurutan, prevalensi delesi tersebut diikuti oleh kategori *severe* Oligoastheno teratozoospermia, Oligoastheno teratozoospermia, *severe* oligoteratozoospermia dan oligoteratozoospermia. Ini menunjukkan bahwa kejadian delesi yang tinggi berhubungan dengan semakin rendahnya kuantitas dan kualitas spermatozoa yang dihasilkan. Kategori oligoteratozoospermia hingga *severe* Oligoastheno teratozoospermia masih mempunyai jumlah spermatozoa.

Dari tujuh gen yang dianalisis, gen sY86 (subregion AZFa) menunjukkan prevalensi delesi yang paling tinggi dan terjadi pada semua kategori spermatozoa dengan kuantitas dan kualitas spermatozoa yang rendah. Analisis delesi untuk tujuh gen tersebut pada sampel normal (kelompok

kontrol) tidak menunjukkan adanya delesi. Kecenderungan terjadinya delesi berikutnya diikuti oleh gen sY84 yang juga bagian dari subregion AZFa. Hal ini agak berbeda dengan hasil-hasil penelitian lain sebelumnya yang menunjukkan bahwa gen – gen yang terdapat dalam subregion AZFa jarang terjadi dibanding AZFb dan AZFc.

Demikian juga dengan subregion AZFc, jika hasil-hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa subregion AZFc merupakan subregion yang paling sering mengalami delesi dibanding subregion AZFa dan AZFb, dari penelitian ini justru menunjukkan bahwa subregion AZFc jarang terjadi delesi. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh beberapa faktor antara lain latar belakang sampel, jumlah sampel dan jumlah gen yang di analisis.

Berdasarkan faktor latar belakang sampel, sampel penelitian ini berasal dari suku (etnis) di Indonesia, terdiri dari suku Jawa 35 orang, Batak 4 orang, Bali 1 orang. Selain itu juga diperoleh sampel etnis Cina 20 orang dan Eropa 2 orang. Etnis yang berbeda membawa latar belakang yang berbeda, misalnya ras Indonesia (Jawa, Batak dan Bali) berbeda dengan ras Cina dan Eropa. Carlton S Coon dalam Daldjoni (1991) membagi ras manusia dalam lima kelompok yaitu Kaukasid (putih), Mongolid (kuning), Negrind (hitam), Australid (hitam) dan Kapid (coklat–kekuningan). Orang Indonesia merupakan percampuran dari tiga ras, yaitu Mongolid, Weddid (hitam) dan Kaukasid dari Iran yang bermigrasi ke Indonesia lewat Asia tenggara sedangkan etnis Cina termasuk kelompok Mongolid dan orang Eropa termasuk kelompok Kaukasid.

Perbedaan ras menyebabkan perbedaan haplotipe Y, yaitu kelompok pria yang membawa perubahan kromosom Y (Jobling & Tyler-Smith, 2000). Dengan demikian jika analisis delesi gen AZF sebelum ini dilakukan pada pria infertil yang bukan berasal dari orang Indonesia (sebagian besar Eropa, beberapa terdiri dari orang Afrika dan Cina), maka kecenderungan delesi

gen AZF dalam penelitian ini berbeda dengan penelitian terdahulu.

Berdasarkan faktor jumlah sampel, sampel dalam penelitian ini adalah mereka yang datang secara sukarela ke klinik Infertilitas, sehingga diperoleh jumlah apa adanya termasuk tidak seimbang jumlah sampel untuk masing-masing suku.

Berdasarkan faktor Jumlah gen yang dianalisis, Teng *et al.*, (2007) merekomendasikan 29 gen AZF yang digunakan untuk analisis delesi, sembilan gen subregion AZFa dan empat gen subregion AZFc.

Jika dilihat dari lokasi gen yang dianalisis, ada 4 gen yang mengalami delesi pada semua kategori spermatozoa yaitu gen sY84, sY86 (keduanya subregion AZFa), gen sY134 (subregion AZFb) dan sY255 (subregion AZFc). Ini berarti rendahnya kuantitas dan kualitas spermatozoa belum dapat ditentukan dari adanya delesi salah satu gen AZF atau salah satu subregion AZF saja. Beberapa sampel pada masing-masing kategori spermatozoa tersebut diatas tidak mengalami delesi gen AZF, artinya mereka mempunyai semua gen AZF tersebut. Hal ini dapat terjadi karena penelitian ini hanya menganalisis tujuh gen AZF saja.

Selain sampel azoospermia, yaitu sampel oligoteratozoospermia, *severe* oligoteratozoospermia, Oligoasthenoteratozoospermia dan *severe* Oligoasthenoteratozoospermia, hanya kategori *severe* Oligoasthenoteratozoospermia saja yang memiliki sampel yang mengalami delesi hingga enam gen AZF (2 orang). Kategori ini juga satu-satunya yang mempunyai sampel dengan delesi gen DAZ/sY254. Ini menunjukkan luasnya delesi yang terjadi (melibatkan banyak gen) akan menyebabkan spermatozoa yang dihasilkan semakin rendah kuantitas dan kualitasnya. Kategori *severe* Oligoasthenoteratozoospermia adalah kategori yang paling parah diantara kategori yang mempunyai spermatozoa.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka dapat ditarik kesimpulan bahwa prevalensi delesi pada kategori

azoospermia lebih tinggi dibanding prevalensi pada kategori yang lain. Secara berurutan, prevalensi delesi tersebut diikuti oleh kategori *severe* Oligoasthenoteratozoospermia, Oligoasthenoteratozoospermia, *severe* oligoteratozoospermia dan oligoteratozoospermia. Gen yang paling

sering mengalami delesi adalah gen sY86, diikuti oleh sY84, sedangkan gen yang paling jarang mengalami delesi adalah gen DAZ/sY255. Delesi yang melibatkan banyak gen AZF berhubungan dengan semakin rendahnya kuantitas dan kualitas spermatozoa.

ARTIKEL

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	garuda.ristekdikti.go.id Internet Source	2%
2	shodhganga.inflibnet.ac.in Internet Source	2%
3	etd.lib.metu.edu.tr Internet Source	1%
4	id.123dok.com Internet Source	1%
5	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	1%
6	www.krbogor.lipi.go.id Internet Source	1%
7	Submitted to Universitas Brawijaya Student Paper	<1%
8	online-journal.unja.ac.id Internet Source	<1%
9	es.scribd.com Internet Source	<1%

10

greeneers.blogspot.com

Internet Source

<1%

11

Erna Yunita Sari, Bhakti Karyadi, Aceng Ruyani, Choirul Muslim. "Pengaruh Pemberian Ekstrak Kijing (*Pilsbryoconcha exilis*) Pada Pemulihan Kualitas Sperma Mencit (*Mus musculus*)", **PENDIPA Journal of Science Education**, 2019

Publication

<1%

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On