

## ANALISIS MIKRODELESI KROMOSOM Y PADA PRIA AZOOSPERMIA DI INDONESIA

Dwi Anita Suryandari, Nukman Moeloek, Mila Citrawati, Puji Sari, Yurnadi

Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia

E-mail: anitabio@yahoo.co.uk

---

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui frekuensi mikrodelesi kromosom Y pada pria azoospermia di Indonesia. Penelitian ini menggunakan metode PCR dengan lima STS untuk melihat delesi yang timbul pada tiga subregio (AZFa, AZFb, dan AZFc) dan satu STS untuk mengamplifikasi gen SRY yang merupakan kontrol internal. Dari 35 sampel pria dengan azoospermia terdeteksi dua orang (5,7%) yang mengalami mikrodelesi pada kromosom Y (Yq). Mikrodelesi yang terdeteksi dengan enam STS adalah satu orang mengalami delesi pada sY84 (subregio AZFa) dan RBMY1 (subregio AZFb), dan satu orang mengalami delesi pada sY254 dan sY255 (subregio AZFc). Pemeriksaan delesi kromosom Y sangat dianjurkan pada pria azoospermia yang ingin mengikuti program ICSI untuk menghindari kelainan genetik pada keturunannya.

### Abstract

**Analysis of Y Chromosome Microdeletion in Indonesian Males.** The aim of this study is to find out Y chromosome microdeletion in Indonesian azoospermic men. This study used the PCR method with five STS to locate deletion on three different subregions (AZFa, AZFb, and AZFc) of azoospermic men and one STS to amplify SRY gen which act as an internal control. In this study we detected two of 35 (5,7%) azoospermic men had microdeletion Yq. One had microdeletion on subregion AZFa (sY84) and AZFb (RBMY1) and the other one on subregion AZFc (sY254 and sY255). Therefore microdeletion of the Y chromosome in Indonesian azoospermic men exist. Examination of microdeletion of Y chromosomes in azoospermic men is important if they are going to participate in the Intra Cytoplasmic Infection Program to avoid genetic disorders of their descendants.

*Keywords: Y-chromosome, Azoospermia, microdeletion*

---

### 1. Pendahuluan

Salah satu penyebab infertilitas adalah faktor genetik namun selama ini pemeriksaan pria infertil di Indonesia terbatas pada pemeriksaan analisis semen, biopsi testis dan pemeriksaan hormon, sehingga masih banyak pria infertil yang tidak diketahui penyebab infertilitasnya secara pasti. Faktor genetik, khususnya mikrodelesi kromosom Y, merupakan salah satu penyebab infertilitas pria yang dapat diturunkan kepada anaknya melalui teknik reproduksi berbantuan<sup>1</sup>.

Sampai saat ini belum ada penelitian yang menyatakan adanya hubungan yang pasti antara genotip dengan fenotip pada delesi kromosom Y. Keadaan azoospermia dengan mikrodelesi kromosom Y sendiri memiliki patogenesis yang bervariasi<sup>2</sup>. Penelitian dari berbagai negara atau institusi sering menemukan pola tertentu. Delesi gen *Azoospermic factor* pada region A (AZFa)

seringkali terkait dengan SCOS (*Sertoli cells only syndrome*) tipe I atau hipospermatogenesis (angka kejadiannya sangat jarang), delesi AZFb terkait dengan *maturational arrest*, delesi AZFc terkait dengan gangguan spermatogenesis yang sangat bervariasi: berhentinya spermatogenesis pada berbagai tahap, SCOS tipe I dan II<sup>3-4</sup>.

Delesi yang melibatkan dua atau tiga lokus AZF, menyebabkan gangguan spermatogenik lebih berat daripada delesi pada satu lokus. Seringkali pasien yang mengalami delesi lebih dari dua lokus menderita SCOS tipe I dengan analisis semen azoospermia<sup>5</sup>.

Penelitian mikrodelesi kromosom Y telah banyak dilakukan di berbagai negara, sementara itu, belum ada data mengenai mikrodelesi kromosom Y pada pria azoospermia di Indonesia, sehingga menimbulkan pertanyaan berapa besar frekuensi mikrodelesi

kromosom Y pada pria azoospermia di Indonesia dan kandidat gen dan subregio apa saja yang mengalami mikrodelesi?

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui frekuensi mikrodelesi kromosom Y pada pria azoospermia di Indonesia dan untuk mengetahui kandidat gen dan subregio kromosom Y yang mengalami mikrodelesi pada pria azoospermia di Indonesia. Diagnosis delesi kromosom Y mempunyai nilai prognostik yang dapat mempengaruhi pilihan terapi untuk pria infertil sehingga dapat meningkatkan efisiensi waktu dan dana yang diperlukan untuk terapi serta efektifitas tindakan atau terapi selanjutnya.

Pemeriksaan mikrodelesi kromosom Y juga dianjurkan pada pria azoospermia yang mengikuti program reproduksi berbantuan *Intra Cytoplasmic Injection* (ICSI) untuk menghindari adanya transmisi kelainan genetik. Selain itu pemeriksaan mikrodelesi kromosom Y juga dianjurkan dalam konseling genetik untuk memberi informasi tentang risiko menghasilkan anak laki-laki dengan gangguan spermatogenesis.

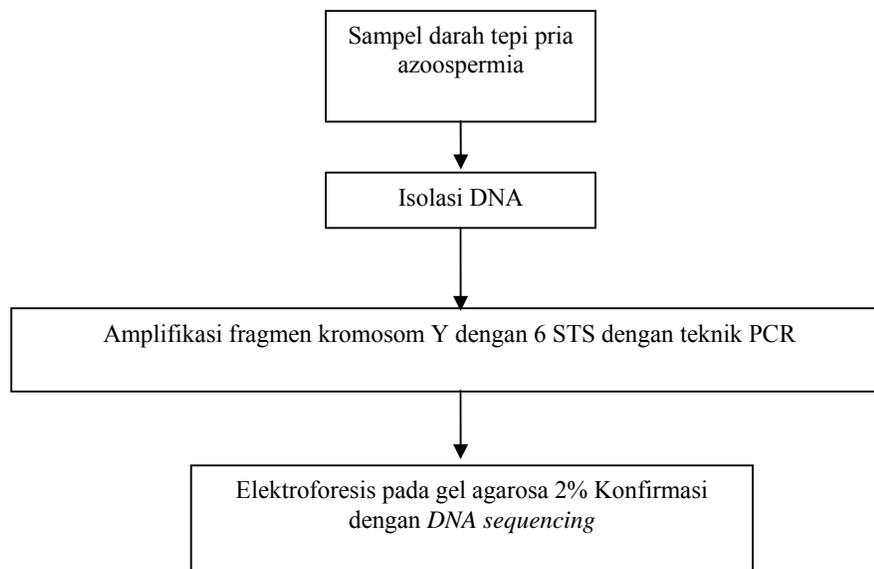
## 2. Metodologi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui frekuensi mikrodelesi kromosom Y dan gen kandidat serta subregio kromosom Y yang mengalami delesi pada pria azoospermia di Indonesia. Kriteria azoospermia ditentukan dari hasil analisis semen azoospermia dan

pemeriksaan fruktosa positif (azoospermia non obstruktif pada vas deferens dan duktus ejakulatorius). Semua pria yang terlibat dalam penelitian ini diambil darah tepinya dan dilakukan isolasi DNA. Analisis mikrodelesi kromosom Y menggunakan 6 *sequence tags sites* (STS) pada kromosom Y yang kemudian diamplifikasi dengan metode PCR (Gambar 1). Mikrodelesi kromosom Y ditandai dengan tidak terbentuknya pita spesifik sesuai STS. Hasil yang diperoleh dianalisis untuk menentukan frekuensi dan gen kandidat serta subregio yang mengalami mikrodelesi pada pria azoospermia di Indonesia.

Sampel diperoleh dari pria azoospermia di Indonesia yang diwakili oleh pasien yang datang ke Departemen Biologi Kedokteran FKUI, RS. Mitra Keluarga Bekasi, RS. Hermina Bekasi, dan RS Hermina Jatinegara. Diagnosis azoospermia ditentukan dari hasil pemeriksaan analisis semen. Kriteria pasien azoospermia yang dipakai adalah infertilitas primer dengan analisis semen azoospermia dan tes fruktosa positif. Pemeriksaan dan anamnesis pasien (tanda-tanda seks sekunder, ukuran testis) dilakukan oleh dokter spesialis andrologi.

Semua pria yang bersedia ikut penelitian harus menandatangani formulir persetujuan yang telah disetujui oleh panitia etik FKUI. Darah tepi yang diperoleh dari pasien disimpan dalam tabung vacutener yang berisi zat antikoagulan *Ethylene Diamin Tetra acetic Acid* (EDTA).



Gambar 1. Strategi Penelitian

DNA diisolasi dari 3 ml darah tepi yang diambil dari 35 pria azoospermia. Selanjutnya DNA diamplifikasi menggunakan metode PCR pada mesin *Gene Amp. PCR System 9700* (Perkin Elmer). Setiap sampel DNA diuji untuk 6 lokus gen (interval 5 dan 6) dari kromosom Y. Enam STS tersebut adalah untuk SRY: sY14 yang merupakan kontrol internal, untuk subregio AZFa adalah sY84, AZFb adalah sY143 dan RBMY1, dan AZFc adalah sY254, sY255.

Sampel pria normozoospermia digunakan sebagai kontrol positif dan sampel wanita fertil digunakan sebagai kontrol negatif sedangkan aquabides digunakan sebagai blanko. Kontrol positif digunakan untuk memastikan apabila pita spesifik tak muncul bukan karena kesalahan kerja, alat atau bahan, sedangkan kontrol negatif digunakan untuk memastikan apabila pita spesifik muncul bukan karena kontaminasi.

Hasil amplifikasi dideteksi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% dalam larutan dapar TAE 1X (0,04 M Tris asetat, 0,002 M EDTA pH 8,0). DNA ampikon sebanyak 4 µl dicampur dengan 1 µl *tracking dye* (0,25% xylene cyanole, 25% sukrosa, 0,25% bromo phenol blue). DNA ampikon dielektroforesis pada tegangan 96 volt selama 50 menit. Sebagai marka digunakan 100 pb *DNA ladder* (Promega). Selanjutnya gel agarosa yang telah dielektroforesis dimasukkan ke dalam larutan TAE 1X yang mengandung etidium bromida (0,5 µl/mL) selama 10-15 menit sambil digoyang pada *shaker* (*IKA Labortechnik HS250 basic*). Pita fragmen DNA hasil elektroforesis diamati pada *UV transiluminator* lalu dibuat dokumentasinya menggunakan Kodak EDAS 290. Hasil negatif (adanya delesi) disimpulkan setelah

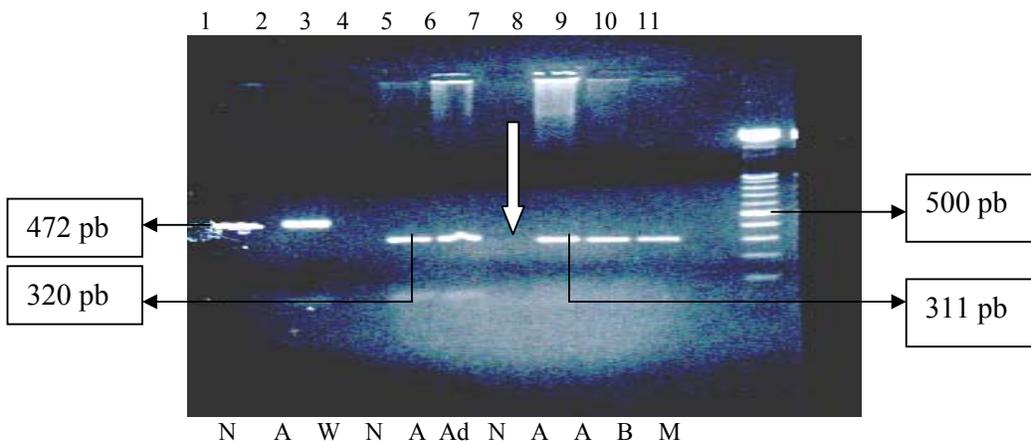
sedikitnya tiga kali kegagalan amplifikasi bersamaan dengan suksesnya amplifikasi kontrol internal.

Munculnya pita spesifik dengan ukuran tertentu pada gel agarosa 2% yang telah divisualisasi dengan etidium bromida di bawah sinar UV menunjukkan hasil positif, artinya bahwa pada pria tersebut dijumpai adanya gen kandidat yang diperiksa. Tidak munculnya pita spesifik menunjukkan hasil negatif, artinya pria tersebut mengalami mikrodelesi pada gen kandidat yang diperiksa. Frekuensi gen kandidat dan subregio yang mengalami delesi (ketiadaan pita spesifik setelah amplifikasi) yang terjadi pada kelompok pria azoospermia untuk setiap STS dihitung jumlahnya.

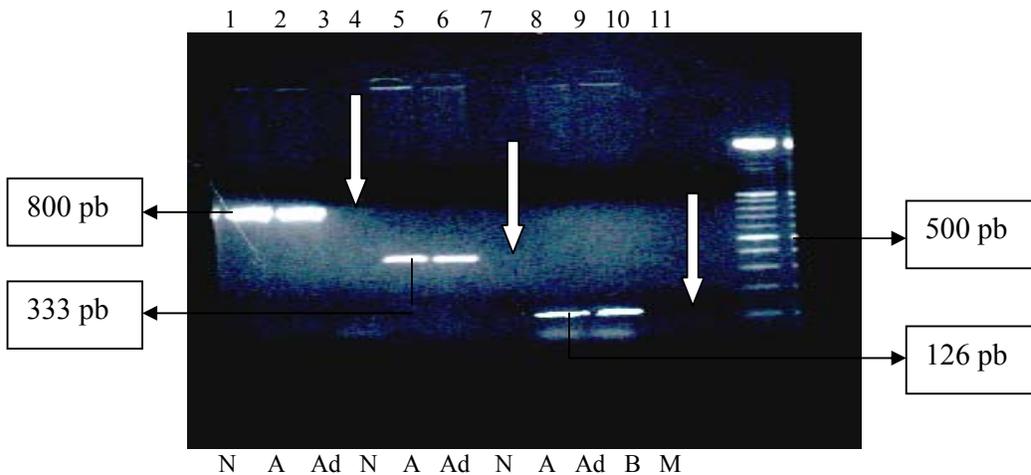
### 3. Hasil dan Pembahasan

Setiap sampel DNA diuji menggunakan enam STS. Hasil amplifikasi dengan PCR dideteksi dengan elektroforesis pada gel agarosa 2% dalam larutan dapar TAE 1X. Hasil berupa pita-pita DNA spesifik dengan besar yang sesuai dengan diharapkan serta adanya delesi pada beberapa subregio (Gambar 2 dan 3)

Didapatkan mikrodelesi kromosom Y pada pria azoospermia di empat STS: sY84 (AZFa), RBMY1 (AZFb), sY254, dan sY255 (AZFc). Diagnosis mikrodelesi ditegakkan setelah kegagalan amplifikasi sebanyak tiga kali bersama dengan berhasilnya amplifikasi kontrol positif. Sampel DNA wanita fertil digunakan sebagai kontrol negatif (menguji spesifisitas dan kemungkinan kontaminasi) dan aquabides sebagai kontrol terhadap kontaminasi reagen yang dipakai.



**Gambar 2.** Hasil elektroforesis produk PCR dengan STS sY14, sY84, sY143, pada pria normozoospermia (N), pria azoospermia (A), pria azoospermia dengan delesi (Ad), wanita fertil (W), dan blanko (B) Sumur 1-3 =sY14, 4-6=sY84, 7-9=sY143, 10=blanko 11=marka (M)



**Gambar 3.** Hasil elektroforesis produk PCR dengan STS RBM1, sY254, sY255, pada pria normozoospermia (N), pria azoospermia (A) pria azoospermia dengan delesi (Ad), dan pada wanita fertil (W), blanko (B). Sumur 1-3=RBM1, 4-6=sY254, 7-9=sY255, 10=blanko, 11=marka (M)

Dari 35 sampel pria azoospermia, terdeteksi dua orang yang mengalami mikrodeselesi pada kromosom Y. Hasil skrining menunjukkan ada satu orang dengan mikrodeselesi pada STS sY84 (AZFa) dan STS RBMY1 (AZFb) dan satu orang pada STS sY254 dan sY255 (AZFc). Tidak ditemukan adanya delesi kromosom Y pada pria normozoospermia sebagai kontrol positif pada keenam STS uji. Demikian pula pada sampel wanita fertil sebagai kontrol negatif tidak terbentuk pita spesifik. Dengan demikian, frekuensi mikrodeselesi kromosom Y pada pria azoospermia di Indonesia adalah 2/35 (5,7%). Gen kandidat dan subregio yang mengalami delesi terdeteksi pada empat STS (tiga subregio) yaitu : satu (2,8%) dari 35 pria azoospermia di Indonesia mengalami mikrodeselesi kromosom Y pada STS sY84 yang mewakili subregio AZFa dan RBMY1 yang mewakili subregio AZFb dan satu (2,8%) lainnya dari 35 pria azoospermia di Indonesia mengalami mikrodeselesi pada sY254, sY255 yang mewakili gen DAZ pada subregio AZFc.

Saat ini infertilitas merupakan masalah kesehatan yang penting dan ditemukan pada 10% sampai 15% pasangan suami istri. Faktor pria berperan pada sekitar 50% kasus. Empat puluh sampai limapuluh persen dari pria-pria tersebut mengalami abnormalitas produksi sperma baik kualitatif maupun kuantitatif. Lebih dari 60 % kasus belum diketahui penyebab menurunnya fungsi testis yang menyebabkan infertilitas tersebut. Penelitian terakhir menunjukkan, bahwa faktor genetik dan lingkungan dapat mempengaruhi menurunnya kesehatan reproduksi pria<sup>2</sup>. Penelitian dengan menggunakan *molecular markers* seperti STS yang telah banyak terpetakan sepanjang kromosom Y menjadi bukti definitif bahwa ada lokus-lokus pada lengan panjang kromosom Y yang diperlukan untuk diferensiasi sel

germinal. Dari berbagai penelitian paling tidak telah didefinisikan adanya tiga interval *non-overlapping* yang masing-masing berhubungan dengan gangguan spermatogenesis dengan derajat yang bervariasi<sup>2-5-8</sup>. Interval-interval ini adalah AZFa, AZFb, dan AZFc yang mengindikasikan bahwa paling tidak ada tiga lokus yang berbeda pada lengan panjang kromosom Y yang penting pada proses diferensiasi sel germinal<sup>9</sup>.

Metode skrining mikrodeselesi berdasarkan teknologi PCR dengan menggunakan STS spesifik untuk kromosom Y telah dipublikasikan sejak tahun 1992<sup>10</sup>. Pada prinsipnya analisis dengan menggunakan hanya satu STS non-polimorfik untuk setiap regio AZF sudah cukup untuk menentukan apakah ada delesi gen pada regio AZFa, AZFb, atau AZFc. Analisis dengan menggunakan dua STS untuk setiap regio akan meningkatkan akurasi diagnosis, karena delesi sering terjadi pada lebih dari satu lokus STS. Sebagai kontrol digunakan DNA pria normozoospermia untuk kontrol positif eksterna (menguji spesifisitas dan sensitivitas), DNA wanita fertil dan blanko sebagai kontrol negatif (menguji spesifisitas dan kemungkinan kontaminasi). Gen SRY (STS sY14) diikuti sertakan sebagai kontrol positif interna karena bahwa gen SRY berperan mengarahkan perkembangan gonad indeferen menjadi testis<sup>1,12</sup>.

Penelitian ini menggunakan teknik PCR dengan serial STS yang terdiri atas 6 STS berhasil menemukan delesi Yq pada 2 dari 35 (5,7%) pria azoospermia. Pada kontrol positif (pria normozoospermia) menghasilkan ukuran DNA amplicon sesuai dengan yang diharapkan sedangkan pada kontrol negatif (wanita fertil) tidak terjadi amplifikasi.

Delesi AZFa sangat jarang terjadi namun tak dapat diabaikan. Dalam penelitian ini ditemukan ada satu dari 35 pria azoospermia di Indonesia mengalami delesi pada STS sY84 (subregio AZFa) dan RBMY1 (subregio AZFb). Pada pria tersebut tidak diketahui apakah delesi pada subregio AZFa itu utuh atau tidak. Untuk mengetahui hal tersebut, harus dilakukan amplifikasi menggunakan STS sY86<sup>1</sup>. Beberapa peneliti telah melakukan analisis mikrodelesi kromosom Y pada berbagai populasi namun frekuensi terjadinya mikrodelesi berbeda-beda pada tiap populasi<sup>1,9,13,14</sup>.

Delesi gen pada subregio AZFb ditemukan pada beberapa pasien: azoospermia dan oligozoospermia. Pria azoospermia memiliki gambaran histologi yang bervariasi, yaitu SCOS, *meiosis arrest*, *maturation arrest* pada tahap spermatosit dan spermatid<sup>8</sup>. STS yang digunakan untuk mendeteksi delesi gen pada regio AZFb pada penelitian ini adalah sY143 dan RBMY1. Ditemukan satu pasien yang mengalami delesi pada STS RBMY1 yang juga delesi pada sY84 (subregio AZFa).

Pada penelitian ini delesi gen pada subregio AZFc ditemukan satu dari 35 (2,8%) pria azoospermia di Indonesia. Deteksi delesi pada subregio ini menggunakan STS sY254 dan sY255 yang merupakan *marker* spesifik untuk gen DAZ. Ketiadaan pita hasil amplifikasi dengan kedua STS tersebut mengindikasikan adanya delesi pada seluruh subregio AZFc. Delesi sebagian *copy* gen DAZ mungkin saja terjadi pada sampel azoospermia yang diteliti, namun belum dapat dideteksi dengan STS yang ada. Dari berbagai penelitian yang telah dilakukan, deteksi delesi seluruh subregio AZFc dapat ditegakkan dengan adanya delesi pada STS sY254 dan sY255. Pasien-pasien tersebut memiliki gambaran histologi testis yang sangat bervariasi dan terkadang spermatozoa masih dapat ditemukan di testis atau dalam ejakulat. ICSI dengan *Testicular Sperm Extraction* (TESE) masih dapat dilakukan<sup>1,15</sup>.

Mengingat pentingnya pemeriksaan ini maka perlu dilakukan analisis mikrodelesi lebih lanjut dengan jumlah sampel dan STS yang lebih banyak. Pria infertil yang mengalami delesi pada regio yang sama dapat memiliki gangguan spermatogenesis yang bervariasi. Ada beberapa penjelasan mengenai hal tersebut adalah: pertama, sangat sulit untuk memastikan apakah setiap STS hanya menunjukkan satu lokasi saja pada kromosom tersebut, sehingga apabila terjadi delesi tampak pada lokasi yang sama namun dapat saja berbeda. Kedua, adanya variasi antar individu yang merupakan modifikasi fenotip sebagai akibat kombinasi X dan Y mosaik pada sel germinal, sehingga ada beberapa sel germinal yang mempunyai kromosom Y yang utuh. Keadaan mosaik ini dapat saja tidak terdeteksi pada DNA yang diambil dari sel darah putih.

Ketiga, variasi fenotip ini juga dapat menggambarkan adanya alel gen yang dapat bermodifikasi sehingga hilangnya fungsi gen-gen pada kromosom Y dapat dikompensasi<sup>9,16</sup>. Pemeriksaan delesi Yq pada pria infertil azoospermia memiliki implikasi klinik dan etik yang penting, terutama dengan semakin meningkatnya keberhasilan teknik reproduksi berbantuan pada pasien azoospermia. Analisis mikrodelesi diharapkan akan membantu ahli andrologi dalam diagnosis dan pemberian terapi<sup>16</sup>.

#### 4. Kesimpulan

Ditemukan dua dari 35 (5,7%) pria azoospermia di Indonesia yang mengalami mikrodelesi pada kromosom Y. Delesi subregio AZF pada pria azoospermia di Indonesia terdapat pada gen kandidat di subregio AZFa yaitu pada STS sY84, subregio AZFb pada STS RBMY1, dan subregio AZFc pada STS sY254 dan sY255. Satu dari 35 (2,8%) pria azoospermia mengalami delesi kromosom Y di subregio AZFa dan AZFb dan satu lainnya dari 35 (2,8%) pada subregio AZFc.

Perlu dilakukan analisis mikrodelesi lebih lanjut dengan jumlah sampel dan STS yang lebih banyak. Pemeriksaan mikrodelesi kromosom Y dapat digunakan sebagai salah satu metode untuk menegakkan diagnosis dan pemberian terapi pada infertilitas pria. Pada pria infertil yang mengikuti teknik reproduksi berbantuan perlu dilakukan skrining mikrodelesi kromosom Y karena adanya risiko diturunkannya cacat genetik pada anak laki-laki yang dihasilkan dari teknik tersebut.

#### Daftar Acuan

1. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN Best Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Y-chromosomal Microdeletions: State of The Art 2004. *Int J Androl* 2004; 27: 1-10.
2. Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Molecular Screening for Yq Microdeletion in Men with Idiopathic Oligozoospermia and Azoospermia. *J Biosci* 2003; 28: 163-168.
3. Loginova JA, Nagornaya II, Shlikova SA, et al. Molecular Genetic Analysis of Y chromosome Microdeletions in Men with Severe Spermatogenic Defects. *Mol Biol* 2003; 37: 67-73.
4. El Awady MK, El Shater SF, Ehabaragaa, et al. Molecular Study in Chromosome Y Microdeletion in Egyptian Males with Idiopathic Infertility. *Asian J Androl* 2004; 3: 55-57.
5. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y Chromosome Azoospermia (AZF) Mapped to Different Suregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-943.

6. Vogt PH. Molecular Genetic of Human Male Infertility: From Genes to New Therapeutic Perspectives. *Curr Pharm Design* 2004; 10: 1-30.
7. Pryor JL, Ken-First M, Muallem A, et al. Microdeletion in the Y Chromosome of Infertile Men. *N Engl. J Med* 1997; 336: 534-539.
8. Ken-First M, Ryan A, Schifreen R, et al. The Genetic Bases of Male Infertility. *Lancet* 1997; 348: 332.
9. Affara NA. The Role of the Y Chromosome in Male Infertility. *Expert Review in Molecular Medicine*, 2001.
10. Raicu F, Popa L, Apostol P, et al. 2003. Screening for Microdeletions in Human Y Chromosome-azf Candidate Genes and Male Infertility. *J Cell Mol. Med.*, 7: 43-48
11. Nieschlag E, Behre HM. *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, 2nd ed. Munich, Springer, 2000.
12. Elliott DJ, Millar MR, Oghene K, et al. Expression of RBM in The Nuclei of Human Germ Cells is Dependent on a Critical Region of The Y Chromosome Long Arm. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3848-3852.
13. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletion and Alterations of Spermatogenesis. *Endocrine Rev* 2001; 22: 226-239.
14. Lin YM, Lin YH, Teng YN, et al. Gene-based Screening for Y Chromosome Deletions in Taiwanese Men Presenting with Spermatogenic Failure. *Fertil Steril* 2002 ; 77: 897-903.
15. Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, et al. Screening for Microdeletion of Y Chromosome Genes in Patients Undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection. *Hum Reprod* 1999 ; 14: 1717-1721.
16. Ferlin A, Moro E, Garrola A, et al. Human Male Infertility and Y Chromosome Deletions: Role of The AZF-Candidate Genes DAZ, RBM, and DFFRY. *Hum Reprod* 1999; 14: 1710-1716.