

# **DISERTASI**

**MIKRODELESI GEN RBM DAN DAZ  
PADA PRIA PASANGAN INFERTIL  
DALAM MASYARAKAT  
YANG MELAKUKAN KAWIN KERABAT  
(Studi di Desa adat Tenganan Pegringsingan,  
Kabupaten Karangasem, Propinsi Bali)**



**HUDI WINARSO**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2005**

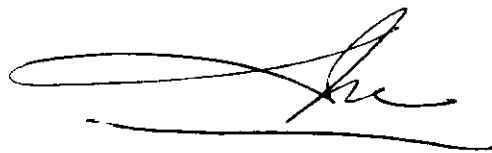
**LEMBAR PENGESAHAN**  
Disertasi telah disetujui tanggal 30 Desember 2009

Promotor



Prof. Dr. P.G. Konthen, dr., Sp.PD-KAI  
NIP : 130189825

Kopromotor



Dr. F.M. Judayana, dr., Sp.PK.  
NIP: 130675539

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)  
Tanggal 23 Februari 2005

**PANITIA PENGUJI DISERTASI**

- Ketua** : Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., M.S.  
**Anggota**: 1. Prof. Dr. PG. Konthen, dr., Sp.PD-KAI  
2. Dr. F.M. Judajana, dr., SpK(K)  
3. Prof. Dr. H.J. Glinka, SVD  
4. Prof. Dr. I Made Subratha, dr., Sp.And.  
5. Siti Pariani, dr., M.S., M.Sc., Ph.D.  
6. Aucky Hinting, dr., Sp.And., Ph.D.  
7. Maria Inge Lusida, dr., M.Kes., Ph.D.

Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Rektor Universitas Airlangga  
Nomor : 1553/J03/PP/2005  
3 Maret 2005



**UCAPAN TERIMA KASIH**

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji syukur kehadirat Tuhan yang Maha Kuasa, atas segala rahmat dan karuniaNYA sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Prof.Dr. P.G. Konthen, dr., Sp.PD-KAI., sebagai promotor beliau telah menghantarkan saya melewati jenjang pendidikan tertinggi. Beliau senantiasa meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan pengarahan dengan penuh kesabaran, perhatian dan memberikan dorongan semangat sehingga saya mampu menyelesaikan pendidikan ini. Wawasan keilmuan beliau dan sikap sebagai seorang ilmuwan sejati, patut diteladani. Semoga Tuhan selalu memberikan berkat dan kesehatan kepada beliau.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya serta penghargaan yang setinggi-tingginya juga saya haturkan kepada Dr. F.M. Judayana, dr., Sp.PK(K), sebagai ko-promotor. Beliau selalu menyediakan waktu untuk saya dalam bimbingan keilmuan, membantu membangun konsep berfikir saya serta pengarahan dalam penyelesaian disertasi ini. Dari beliau saya mendapatkan wawasan keilmuan sehingga saya harus bisa bersikap sebagai ilmuwan yang profesional. Semoga Tuhan yang Maha Pengasih selalu melimpahkan rahmatNYA kepada beliau.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Prof.Dr. Indrayana Notosoehardjo, dr., Sp.F.(Alm), semasa hidupnya sebagai ko-promotor saya, beliau sangat antusias mendorong saya untuk melakukan penelitian pada masyarakat dengan tradisi yang eksklusif ini. Keteladanan dalam keilmuan dari beliau, menjadi pendorong semangat saya untuk pantang menyerah dalam menghadapi hambatan selama penelitian ini, semoga beliau mendapat tempat yang layak disisiNYA.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Pemerintah Republik Indonesia cq Menteri Pendidikan Nasional, melalui Tim Manajemen Program Doktor yang telah memberikan beasiswa sehingga dapat meringankan beban penelitian saya.

Dengan terselesainya penulisan disertasi saya ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya pula kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Med. Puruhito, dr., Sp.B.-TKV. atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor hingga selesainya pendidikan ini di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof.Dr.Muh.Amin, dr., Sp.P(K) yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Prof.Dr.Mandojo Rukmo, drg., MSc., Sp.KG. selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, serta mantan Ketua Program Studi, Prof.Dr. Juliati Hood A., dr., MS., Sp.PA., FIAC., yang telah melaksanakan tugasnya dalam membantu proses kelancaran dalam pendidikan dan pengajaran saya pada Program Doktor di Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Prof. I G.B. Amitaba, drh. (Alm), mantan penasehat akademis selama saya menempuh program doktor dan juga semasa hidupnya pernah sebagai Kepala Laboratorium Biomedik tempat saya bekerja. Keteladanan dalam keilmuan,

kesabaran dan kebijaksanaannya sebagai Pimpinan merupakan keteladanan yang luar biasa; bahkan menjelang akhir hayatnya ketika berbaring di rumah sakit, beliau masih menanyakan kemajuan penelitian yang saya lakukan. Semoga beliau mendapat tempat yang layak disisinya.

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof.Dr. H.M.S. Wiyadi, dr., Sp.THT. yang telah memberi ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada para dosen pemberi mata kuliah penunjang disertasi (MKPD) : Prof. Dr. J. Glinka, SVD., Prof. I G.B. Amitaba, drh., (alm), Prof. Dr. Indro Handojo, dr., Sp.PK (K) yang banyak memberikan bekal ilmu dalam penyusunan kerangka ilmiah disertasi ini.

Tak lupa juga saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada para dosen pemberi mata kuliah pada semester I dan II : Prof. Poernomo Soerjohusodo, dr.; Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH (alm).; Prof. Dr. J. Glinka, SVD.; Prof. Bambang Rahino, dr.; Prof. Soetandyo Wignyosoebroto, MPA.; Prof.Dr. Koento Wibisono Siswomihardjo; Prof.Dr. Sarmanu, drh., MS.; Prof.Dr. Zainudin, drs.Apt.; Prof.Dr.Suhartono Taat Putro, dr., MS.; Widodo J. Pudjihardjo, dr., MS., MPH., Dr.PH.; Siti Pariani, dr., MPH., Ph.D.; Fuad Amsyari, dr., Ph.D.; Prof.Dr. L.Dyson.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Prof.Dr.Med. Syukri Erfan Kusuma, dr., Sp.F., selaku pimpinan laboratorium *human genetic TDC* Universitas Airlangga, serta kepada Prof.Dr.H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., selaku Ketua TDC Universitas Airlangga, atas ijin penggunaan fasilitas laboratorium untuk analisa delesi gen di TDC Universitas Airlangga.

Terima kasih pula saya ucapkan kepada Hj. Siti Mutiroh M., dra., MS., selaku Ketua Bagian Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof.Dr. Koentjoro Soehadi, dr. (alm) dan H. Soeharno H., drs., MS. sebagai mantan Kepala Bagian, tempat saya bekerja. Juga kepada Prof. A. Marlinata, dr. saya mengucapkan terima kasih atas bimbingannya, khususnya dalam bidang seksologi.

Secara khusus pula saya ucapkan terima kasih kepada rekan sejawat di Bagian Biomedik, para senior saya Onny Pieters Sono, dr., Sp.And., yang selalu meluangkan waktu untuk berdiskusi tentang materi ilmiah, Aucky Hinting, dr., Sp.And., Ph.D. atas dukungan dalam banyak hal yang tidak ternilai dengan apapun; dan Dr. Rina Yudiwati, dr., MS., atas kerjasama selama ini. Juga kepada rekan sekantor: Hamdani Lunardhi, dr., M.Kes., Sp.And., H.R. Haryanto Aswin, dr., MS., M.P.B. Dyah Pramesti, dr., M.Kes., Sri Musta'ina, dra., MS., dan Reny I'tishom, Spi., MSi., atas kerjasama yang baik selama ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada Prof.Dr.FX Arif Adimoelja, dr., MSc., Sp.And., melalui beliau saya difasilitasi untuk dapat menghadiri forum ilmiah internasional andrologi di berbagai negara. Juga kepada para senior dari Laboratorium Biomedik yang sudah purna tugas, P. Adisetija, dr., M.Djamil, drs. dan Hj. Amirah, Ir. atas keteladanan dan kerjasama selama ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada teman-teman satu angkatan dalam Pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga : Dr. Aulanni'am, drh., DES.; Dr. Gempur Santoso, drs., MKes.; Dr.

Anwar Ma'ruf, drh., MKes.; Dr. Sri Wahjuningsih, Ir., MSi.; Dr. Minsja T. Djaling, drs., MKes.; Dr. Sri Sulistyorini, dra., MPd.; Prof.Dr. Teddy Ontoseno, dr., SpJP., Sp.A (K); Dr. Ariyanta Harsono, dr., Sp.A (K).; Dr. Theresia Indah Budhy S., drg., MKes.; Dr. Slamet Riyadi, drh., MSi.; Dr. Retno Pudji Rahayu, drg., MKes.; Dr. Sulistiana Prabowo, dr., MS., Dr. Pudji Srianto, drh., MKes., Dr. Indah Listiana Kriswandani, drg., MS., Sri Kunarti, drg., MS.; CA Nidom, drh., MS.; Moh. Hasan Machfoed, dr., Sp.S.; Ikeu Ekayanti, Ir., MKes., M.Saiful Islam, dr., Sp.S.; Djelita Rickum, SKM., MKes.; Sugiharto, drs., MS.; Doti Wahyuningsih, dr., MKes.; Didik Budijanto, drh., MKes.; Hadi Ismono, dr., MKes., atas dukungan dan kerjasama yang baik selama ini.

Secara khusus saya ucapkan terima kasih kepada Dr. Evi Hanizar, dra., MS., atas dukungan dan bantuan ilmiah yang tidak ternilai sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

Terima kasih secara khusus saya sampaikan kepada Prof.Dr. H. Sarmanu, drh., MS. dan Dr. Hari Basuki, dr., MS., atas dukungan konsultasi statistik dalam penelitian ini. Juga kepada Maria Inge Lusida, dr.,MKes.,Ph.D. serta C.A. Nidom, drh.,MS. atas bantuan dalam analisa homologi gen di laboratorium TDC Universitas Airlangga.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada para guru yang telah mendidik saya, dari mulai sekolah dasar, sekolah menengah pertama, sekolah menengah atas, hingga perguruan tinggi; sehingga saya bisa mencapai jenjang pendidikan tertinggi ini.

Terima kasih tak terhingga saya sampaikan kepada kedua orang-tua saya, ayah Djoepri Prijosasmito (alm), ibu saya Moerinta, keteladanan dan ketekunan beliau mendorong saya untuk selalu menuntut ilmu hingga jenjang tertinggi. Kepada saudara kandung saya (beserta suami/istri) : Slamet Haryanto, W. Haryono, Hari Sutjiati, Wasis Wardoyo, Agus Wijanarko, Yusuf Wijaya dan Andreas Prijambodo, saya mengucapkan terima kasih atas dukungannya selama ini. Juga kepada adik dari istri saya yang selama ini banyak membantu pelaksanaan penelitian di luar kota, Doni beserta istri, saya mengucapkan terima kasih. Kepada Sdr. Slamet Riadi yang telah membantu pengetikan naskah ini, saya mengucapkan terima kasih.

Kepada Istriku tercinta, yang dengan sabar dan selalu mendukung untuk terus maju mencapai jenjang pendidikan ini, Bonita Sri Andhini, dr. serta anak tersayang Abraham Arwinta Sakti, saya mengucapkan terima kasih atas pengertiannya karena seringnya saya tinggal untuk urusan studi ini.

Kepada Prof. Soetedjo Mertodidjojo, dr., (alm), eyang dari istri saya, terima kasih atas dukungan fasilitas sehingga saya dapat bekerja dan belajar dengan nyaman; Bapak H. Widodo Mertodidjojo beserta keluarga dan Bapak H. Erry Udoyo sekeluarga atas dukungannya.

Dan masih banyak pihak yang telah membantu sehingga penelitian ini dapat terselesaikan, Bapak Mangku Widia dan Bapak Rita Yudhana sebagai tokoh masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan, Bapak Madri sebagai kepala dusun dan Bapak Putu Suarjana sebagai kepala desa serta seluruh masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan dan Pemerintah Daerah Propinsi Bali serta jajarannya, saya mengucapkan terima kasih. Semoga Tuhan yang Maha Kasih, selalu beserta Bapak dan keluarga.



# RINGKASAN



## RINGKASAN

### MIKRODELESI GEN *RBM* DAN *DAZ* PADA PRIA PASANGAN INFERTIL DALAM MASYARAKAT YANG MELAKUKAN KAWIN KERABAT

Hudi Winarso

Infertilitas dapat disebabkan karena faktor istri (45%), faktor suami (25%), faktor suami dan istri (20%), dan 10% tidak diketahui penyebabnya (*idiopathic infertility*). Pada infertilitas pria 50% karena gangguan spermatogenesis. Penyebab yang paling banyak dilakukan penelitian yaitu faktor genetik yaitu delesi gen yang terkait dengan produksi sperma.

Gen *RBM* (*RNA Binding Motif*) dan *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*) merupakan gen yang terletak dalam kromosom Y (Yq11). Delesi pada gen tersebut berhubungan dengan gangguan spermatogenesis. Variasi fenotip yang terjadi tergantung variasi lokasi delesi, luasnya delesi, etnis, geografi dan tipologi populasi.

Penelitian dilakukan terhadap 20 pria pasangan infertil pada kelompok masyarakat yang melakukan kawin kerabat dan merupakan populasi yang tertutup. Penelitian meliputi dinamika populasi, prevalensi infertilitas, penentuan delesi gen *RBM* dan *DAZ*, sekuen nukleotida gen *RBM* dan *DAZ*, deteksi *Chlamydia trachomatis* urin dengan teknik PCR dan uji hormon FSH, LH serta testosteron darah.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ* pada pria pasangan infertil pada masyarakat yang melakukan kawin kerabat dan mengetahui kemungkinan penyebab infertilitasnya selain karena delesi, faktor infeksi *Chlamydia trachomatis* pada saluran reproduksi dan faktor hormonal yaitu FSH, LH dan Testosteron.

Hasil survey didapatkan 20 pasangan yang menderita infertilitas, dan total 20 pria pasangan infertil tersebut dilakukan evaluasi yang meliputi anamnesa, pemeriksaan fisik, penentuan *Chlamydia trachomatis* urin, uji hormon testosteron, LH dan FSH, analisa sperma serta identifikasi gen *RBM* dan *DAZ*.

Hasil penelitian didapatkan prevalensi infertilitas pada populasi sebesar 19%, prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ* 50% dari subyek yang mengalami infertilitas, sedangkan jika penghitungan delesi salah satu yaitu *RBM* saja, *DAZ* saja, atau keduanya *RBM* dan *DAZ* terdapat prevalensi 65%. Faktor infeksi *Chlamydia trachomatis* dan hormon FSH, LH dan Testosteron tidak menunjukkan pengaruh yang bermakna sebagai penyebab infertilitasnya.

Pada analisa sekuen nukleotida gen *RBM* salah satu sampel, yang kemudian dilakukan uji homologi sekuen nukleotida dengan membandingkan terhadap sekuen nukleotida *RBM NCBI U36218* (*National Center of Biotechnology Information*) didapatkan homologi 84,6%.

Prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ* tersebut di atas merupakan angka yang relatif tinggi dibanding penelitian sejenis yang dilakukan terhadap populasi non kawin kerabat, termasuk dengan seleksi subyek yang akurat yaitu kelompok azoospermia (18%).

Jumlah penduduk yang tidak berkembang, populasi relatif kecil (309 jiwa), tipe tertutup (kawin kerabat), laju fertilitas semakin kecil dan lebih banyak bayi laki-laki yang dilahirkan (3 : 2) merupakan faktor yang kurang menguntungkan dalam aspek reproduksi dari tinjauan genetik .

Delesi gen *RBM* dan *DAZ* dapat diwariskan kepada anak laki-laki, kawin kerabat dan masyarakat tertutup akan memungkinkan rasio prevalensi delesi semakin meningkat sehingga infertilitas pria akan semakin meningkat.

Kesimpulan dari penelitian ini terdapat prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ* yang relatif tinggi pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat (50%), hal tersebut merupakan keadaan yang kurang menguntungkan dari tinjauan reproduksi.

## SUMMARY

### THE MIKRODELETION OF RBM AND DAZ GENES IN MALE PARTNER OF INFERTILE COUPLE IN POPULATION WITH INBREEDING

Hudi Winarso

Infertility may result due to the factor in wife (45%), husband (25%), both (20%) or unknown (10%, idiopathic infertility). Regarding the infertility in male, about 50% because of spermatogenesis defect. Studies that had been frequently carried out were primarily focused on genetic factors, the deletion of gene involved in the production of spermatozoa. The existing phenotypic variation depends on various sites of deletion, the extent of deletion, ethnicity, geographical location, and population typology. RBM (RNA Binding Motif) and DAZ (Deleted in Azoospermia) are genes located at chromosome Y (Yq11). The deletion of these genes is related to subnormal spermatogenesis.

This study was carried out to male partner of infertile couple in closed population with inbreeding that lived in a hilly area 40 meters above sea level. This study observed population dynamics, the prevalence of infertility, the determination of RBM and DAZ genes deletion in male partner of infertile couples, the nucleotide sequence of both genes, the detection of *Chlamydia trachomatis* using PCR, and blood FSH, LH, and testosterone levels. The objective of this study was to find the prevalence of RBM and DAZ genes in male partner of infertile couple in population with inbreeding and to identify the possibility of infertility due to factors other than deletion, such as *Chlamydia trachomatis* infection at reproductive tract and hormonal factors, i.e., FSH, LH and testosterone.

Results of the survey revealed 20 couples had a problem of infertility, and totally 20 male partners of those couples were subjected to evaluation comprising history taking, physical examination, determination of urine *Chlamydia trachomatis*, testosterone, LH, and FSH tests, sperm analysis, and the identification of RBM and DAZ genes.

Results show that the prevalence of infertility was 19%, the prevalence of RBM and DAZ genes deletion was 50%, and the prevalence of deletion of only one, RBM or DAZ, was 65%. The factors of *Chlamydia trachomatis* infection and the hormones of FSH, LH and testosterone showed no significant effect as the cause infertility. The analysis of nucleotide sequence of gene RBM, followed with nucleotide sequence of gene RBM NCBI U36218 (National Center of Biotechnology Information) was 84,6%. The rate of the prevalence both genes deletion was relatively high compared to that found in similar studies on the population without inbreeding, although the subjects, the azoospermic group (18%), had been accurately selected.

Less develop and relatively small number of population (309), closed type (inbreeding), lower fertility rate, and the birth of male infants inlarger number (3 vs 2) became adverse factors from the aspect of population growth. The deletion of RBM and DAZ genes inherited to male offspring, inbreeding, and closed

population may increase the ratio of deletion prevalence, so that the male infertility may also increase. In conclusion, the prevalence of RBM and DAZ genes deletion is relatively high (50%) in male partner of infertile couple who undergoes inbreeding.





**ABSTRACT**

## ABSTRACT

### THE MICRODELETION OF RBM AND DAZ GENES IN MALE PARTNER OF INFERTILE COUPLE IN POPULATION WITH INBREEDING

Hudi Winarso

The existing phenotypic variation depends on various sites of deletion, the extent of deletion, ethnicity, geographical location, and population typology. RBM (RNA Binding Motif) and DAZ (Deleted in Azoospermia) are genes located at chromosome Y (Yq11). The deletion of these genes is related to subnormal spermatogenesis. This study was carried out to male partner of infertile couple who underwent inbreeding in a closed population that lived in a hilly area 40 meters above sea level. This study observed population dynamic, the prevalence of infertility, determination of RBM and DAZ genes deletion in male partner of infertile couple, the nucleotide sequence of both genes, the detection of urinary *Chlamydia trachomatis* using PCR, and blood FSH, LH, and testosterone levels.

The objective study was to find the prevalence of RBM and DAZ genes in male partner of infertile couple in population with inbreeding and to identify possibility of infertility due to factors other than deletion, such as *Chlamydia trachomatis* infection at reproductive tract and hormonal factors, i.e., FSH, LH and testosterone.

Results showed that the prevalence of infertility among population was 19%, the prevalence of RBM and DAZ genes deletion was 50% of male infertile couples, and the prevalence of deletion of only one, RBM or DAZ, or both RBM and DAZ, was 65%. The factors of *Chlamydia trachomatis* infection and hormones of FSH, LH, and testosterone showed no significant effect as the cause of infertility. The rate of the prevalence of both genes deletion was relatively high compared to that found in similar studies on the population without inbreeding, although the subjects, the azoospermic group (18%), had been accurately selected.

Less developed and relatively small number of population (309), closed type (inbreeding), lower fertility rate, and the birth of male infants in larger number became adverse factors from the aspect of population growth. The deletion of RBM and DAZ genes inherited in male spring, inbreeding, and closed population may increase the ratio of deletion prevalence, so that the male infertility also increase. In conclusion, the prevalence of RBM and DAZ genes deletion is relatively high in male partner of infertile couple who undergoes inbreeding.

**Key words :** RBM, DAZ, and Inbreeding



# DAFTAR ISI

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN .....	ii
PANITIA PENGUJI DISERTASI .....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH .....	iv
RINGKASAN .....	vii
SUMMARY .....	ix
ABSTRACT .....	xi
DAFTAR ISI .....	xii
DAFTAR TABEL .....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
DAFTAR SINGKATAN .....	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian .....	6
1.4. Manfaat Penelitian .....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....	8
2.1. Infertilitas .....	8
2.2. Nomenklatur dan Abnormalitas kromosom .....	9
2.3. Gen Subregion AZF .....	12
2.4. Delesi Kromosom Y pada Pria Infertil .....	17
2.5. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	22
2.6. Perkawinan Kerabat .....	23
2.7. Hasil Penelitian Pendahuluan .....	25
BAB 3 KERANGKA KONSEPSUAL PENELITIAN .....	30
3.1. Kerangka Konseptual Penelitian .....	30
3.2. Bagan Kerangka Konsep Penelitian .....	33
BAB 4 METODE PENELITIAN .....	34
4.1. Rancangan Penelitian .....	34
4.2. Populasi dan Sampel Penelitian .....	34
4.3. Variabel Penelitian .....	35
4.4. Alat dan Bahan Penelitian .....	35
4.5. Lokasi Penelitian .....	36
4.6. Prosedur Pengambilan Data .....	36
4.7. Analisis Data .....	44
4.8. Kerangka Kerja Penelitian .....	45
BAB 5 ANALISIS HASIL PENELITIAN .....	46
5.1. Data Penelitian .....	46
5.2. Analisis dan Hasil Penelitian .....	53



BAB 6	PEMBAHASAN .....	62
	6.1. Prevalensi delesi gen subregion AZF .....	62
	6.2. Kasus .....	63
	6.3. Prevalensi delesi gen subregion AZF dan Dinamika Populasi .....	65
	6.4. Infertilitas dan <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	67
	6.5. Hormon FSH dan delesi gen subregion AZF .....	69
	6.6. Analisis homologi sekuen nukleotida gen <i>RBM</i> terhadap sekuen nukleotida gen <i>RBM</i> NCBI .....	70
	6.7. Analisis <i>Pedigree</i> pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan .....	70
	6.8. Saran dan Tindakan Praktis .....	71
BAB 7	PENUTUP .....	72
	7.1. Kesimpulan .....	72
	7.2. Saran .....	73
	DAFTAR PUSTAKA .....	74

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Identifikasi Gen <i>SRY</i> , <i>RBM</i> , dan <i>DAZ</i> .....	46
Tabel 5.2 Persentase delesi gen <i>RBM</i> dan <i>DAZ</i> , delesi gen <i>RBM</i> dan atau <i>DAZ</i> .....	47
Tabel 5.3 Identifikasi infeksi chlamydia darah (ELISA) dan <i>Chlamydia trachomatis</i> urin .....	51
Tabel 5.4 Profil hormon LH, FSH, dan Testosteron .....	52
Tabel 5.5 Identifikasi <i>Chlamydia</i> pada darah (ELISA) .....	55
Tabel 5.6 Hasil analisis delesi subregion AZF terhadap kadar hormon FSH .....	56
Tabel 5.7 Hasil analisis delesi subregion AZF terhadap kadar hormon LH .....	57
Tabel 5.8 Hasil analisis delesi subregion AZF terhadap kadar hormon Testosteron .....	58

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Kromosom Y .....	12
Gambar 5.1 Visualisasi hasil PCR untuk STS <i>SRY</i> menggunakan <i>Marker 100 bp DNA Ladder</i> .....	47
Gambar 5.2 Visualisasi hasil PCR untuk STS <i>RBM</i> menggunakan <i>Wide Range DNA Marker</i> .....	48
Gambar 5.3 Visualisasi hasil PCR untuk STS <i>DAZ</i> menggunakan <i>Wide Range DNA Marker</i> .....	49
Gambar 5.4 Sekuen STS <i>RBM</i> pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan .....	50
Gambar 5.5 Sekuen STS <i>DAZ</i> pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan .....	50
Gambar 5.6 Diagram prevalensi delesi gen <i>RBM</i> dan <i>DAZ</i> , delesi Gen <i>RBM</i> dan atau <i>DAZ</i> .....	53
Gambar 5.7 Homologi Sekuen Nukleotida <i>RBM</i> Tenganan Pegringsingan dengan <i>RBM</i> NCBI .....	54
Gambar 5.8 Diagram kadar FSH dan lokasi delesi .....	56
Gambar 5.9 Diagram kadar LH dan lokasi delesi .....	57
Gambar 5.10 Diagram kadar Testosteron dan lokasi delesi .....	58
Gambar 5.11 Grafik demografi penduduk desa Tenganan P. ....	59
Gambar 5.12 Grafik demografi penduduk laki-laki dan wanita.....	59
Gambar 5.13 Grafik laju fertilitas desa Tenganan .....	60
Gambar 5.14 Diagram perkawinan endogami dan eksogami .....	60
Gambar 5.15 <i>Pedigree</i> ayah proband bukan anak tunggal .....	61
Gambar 5.16 <i>Pedigree</i> ayah proband anak tunggal .....	61

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Data Subyek Penelitian ..... 81
Lampiran 2	Populasi Penduduk Desa Tenganan ..... 82
Lampiran 3	Laju Fertilitas ..... 83
Lampiran 4	Visualisasi hasil PCR untuk STS- <i>RBM</i> ..... 84
Lampiran 5	Visualisasi hasil PCR untuk STS- <i>DAZ</i> ..... 85
Lampiran 6	Hasil Sekuensing gen <i>RBM</i> Tenganan Pegringsingan .... 86
Lampiran 7	Hasil Sekuensing gen <i>DAZ</i> Tenganan Pegringsingan .... 88
Lampiran 8	Lembar Persetujuan Subyek ..... 89
Lampiran 9	Kuesioner ..... 90
Lampiran 10	<i>Pedigree</i> ..... 91

## DAFTAR SINGKATAN

<i>AZF</i>	=	<i>Azoospermic Factor</i>
<i>RBM</i>	=	<i>RNA Binding Motif</i>
<i>DAZ</i>	=	<i>Deleted in Azoospermia</i>
<i>DFFRY</i>	=	<i>Drosophyla Fat Facets Related-Y</i>
<i>DBY</i>	=	<i>DEAD/H Box polipeptide Y-chromosome</i>
<i>NCBI</i>	=	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>LH</i>	=	<i>Luteinizing Hormone</i>
<i>FSH</i>	=	<i>Follicle Stimulating Hormone</i>
<i>TDF</i>	=	<i>Testis Determining Factor</i>
<i>STS</i>	=	<i>Sequence-Tagged Sites</i>
<i>PCR</i>	=	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<i>ELISA</i>	=	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>bp</i>	=	<i>base-pair</i>
<i>eif1AY</i>	=	<i>essential Initiation Factor 1 A, Y isoform</i>
<i>SRY</i>	=	<i>Sex determining Region on Y-Chromosome</i>



# **BAB 1**

# **PENDAHULUAN**

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan sebagai kelompok masyarakat *Bali Aga* melakukan tradisi kawin kerabat dengan patuh, menunjukkan adanya masalah dalam kependudukan yaitu laju fertilitas (*fertility rate*) yang rendah; hal tersebut diduga karena tradisi kawin kerabat yang dilakukan (Breguet, 1985). Dalam kurun waktu 30 tahun (1963 – 1993) terjadi penurunan angka kesuburan yang bermakna. *Global fertility rate* (jumlah kelahiran dalam satu tahun dibagi jumlah wanita umur 15 th – 49 th) menurun dari 0,44 pada tahun 1963 menjadi 0,26 pada tahun 1993. *Selected fertility rate* (jumlah kelahiran dalam 1 tahun dibagi jumlah wanita umur 20 th – 34 th) menurun dari 0,97 pada tahun 1963 menjadi 0,51 pada tahun 1993. Jumlah penduduk tidak bertambah atau mengalami penurunan, 287 jiwa pada tahun 1964, 285 jiwa pada tahun 1974, 293 jiwa pada tahun 1984, 317 jiwa pada tahun 1994 (Breguet, 1994), dan 309 jiwa pada tahun 2004.

Laju fertilitas yang semakin menurun dari waktu ke waktu, dapat karena faktor kesengajaan atau diinginkan misalnya penggunaan kontrasepsi; tetapi dapat juga karena masalah infertilitas. Penyebab infertilitas meliputi faktor non-genetik dan atau faktor genetik. Faktor non-genetik penyebab infertilitas antara lain karena infeksi, secara khusus penyakit menular seksual; tetapi dapat juga karena faktor non-genetik yang tidak terkait infeksi mikroorganisme misalnya varikokel.

Faktor genetik penyebab infertilitas dapat terjadi pada level kromosom : kuantitas kromosom abnormal misalnya kelebihan kromosom X yaitu 47, XXY ataupun kekurangan satu kromosom seks yaitu 46, XO. Jumlah kromosom tetap tetapi mengalami aberasi kromosom. misalnya translokasi. Keadaan infertilitas karena faktor genetik yang manifestasinya pada level gen, antara lain mutasi dan mikrodelesi.(Gelehrter TD & Collins FS, 1990).

Infertilitas merupakan kejadian yang dialami sekitar 10% pasangan suami istri, yang hampir separuhnya disebabkan karena faktor suami (Hull MGR, 1984). Salah satu penyebab infertilitas pria karena faktor genetik yaitu mikrodelesi kromosom Y. Delesi pada lengan panjang kromosom Y (Yq11) dalam region yang disebut *AZF (Azoospermia factor)* akan dapat memberi manifestasi kualitas sperma subnormal yaitu oligozoospermia sampai azoospermia (Moro, 2000; Foresta, 2001; Ferlin, 2003).

Region *AZF* terletak dalam kromosom Y pada region *NR1 (Nonrecombining Region Y)* yang tidak mengalami rekombinasi dengan kromosom X selama meiosis sehingga merupakan satu-satunya bagian haploid dari genom manusia (Krausz & McElreavey, 1999; Foresta, 2001).

Dengan demikian, walaupun kejadian delesi dari region *AZF* bersifat *de novo* (terjadi dalam *germ line* ayah), delesi tersebut dapat diwariskan dari seorang ayah kepada anak laki-lakinya (Vogt, 1996; Pryor, 1997). Pewarisan tersebut dapat terjadi melalui konsepsi alami atau konsepsi dengan bantuan (*Assisted Reproductive Techniques*)(Kent, 1996; Page, 1999; Cram, 2000). Bahkan delesi yang diwariskan dari seorang ayah dapat menjadi lebih luas pada anak laki-



lakinya dengan manifestasi infertil atau sub fertil (Girardi, 1997; Simoni, 1997; Cram, 2000).

Analisis delesi yang diperoleh dari sampel darah pria azoospermia hingga oligozoospermia dengan menggunakan *PCR (polymerase chain reaction)* menunjukkan bahwa region AZF terdiri dari 3 sub region yaitu AZFa (proximal), AZFb (sentral) dan AZFc (distal) (Vogt, 1999; CMGS, 2000). Namun Kent (1999) dan Cram (2000) membagi region AZF menjadi 4 sub region yaitu AZFa, AZFb, AZFc dan AZFd. Hal ini karena diantara peneliti belum ada kesepakatan dan lokus DNA mana yang dianalisis.

Data hasil analisis delesi kromosom Y terhadap 5000 pria infertil dari berbagai negara menunjukkan prevalensi kejadian delesi sangat bervariasi, mulai dari 1% (Van der Ven, 1997) hingga 35% (Ferlin, 1999). Hal ini disebabkan perbedaan kriteria dalam pemilihan pasien. Persentase kejadian delesi lebih tinggi pada kelompok ekstrem oligozoospermia (14%) dan azoospermia non obstruktif (16%) dengan kategori idiopatik (Foresta, 2001).

Laporan Hanizar E (2004) bahwa prevalensi delesi STS-RBM (STS = *Sequence-Tagged Site*) dan atau STS-DAZ pada kelompok azoospermia didapatkan sebesar 29,7% yang meliputi : 12,1% delesi STS-RBM dan STS-DAZ; 9,9% delesi pada STS-RBM saja, dan 7,7% delesi pada STS-DAZ saja. Pada kelompok oligozoospermia dan *severe*-oligozoospermia didapatkan prevalensi delesi STS-RBM dan atau DAZ sebesar 18,7% yang meliputi : 6,6% delesi STS-RBM dan STS-DAZ; 3,3% delesi STS-RBM saja; dan 8,8% delesi STS-DAZ saja.

Kejadian delesi region AZF pada pria pasangan infertil dengan konsentrasi spermatozoa subnormal dari berbagai negara menunjukkan karakteristik tertentu. Pria pasangan infertil oligozoospermia hingga azoospermia di Hongkong (Tse, 2000) dan di Perancis (Seifer, 1999) hanya mengalami delesi pada subregion AZFc, sementara itu pria pasangan infertil dengan abnormalitas yang sama di Amsterdam (Hoffer, 1999) dan Jerman (Maurer, 2001) tidak hanya mengalami delesi pada subregion AZFc tetapi juga subregion AZFa dan AZFb. Sebaliknya, pria pasangan infertil di Irlandia (Friel, 2001) dan Swedia (Osterlund, 2000) yang mengalami delesi pada subregion AZFa, AZFb atau AZFc menampilkan kondisi azoospermia.

Namun demikian, secara umum delesi pada subregion AZFc (60%) lebih sering terjadi dibanding subregion AZFb (16%) atau subregion AZFa (5%) (Hoffer, 1999; Krausz and McElreavey, 1999; Seifer, 1999; Tse, 2000; Foresta, 2001). Perbedaan prevalensi dan lokus terjadinya delesi tersebut mencerminkan adanya perbedaan populasi yang mungkin berhubungan dengan *haplotype* kromosom Y, latar belakang genetik atau pengaruh lingkungan (Krausz & McElreavey, 1999). Berdasarkan perbedaan DNA pada pria yang tidak mengalami delesi kromosom Y, Kuroki et al., (dalam Hargreave, 1999) menemukan 4 kelompok pria pada aspek *haplotypenya* yaitu *haplotype* I, II, III dan IV. Pria *haplotype* II mempunyai jumlah spermatozoa yang lebih rendah dibanding pria dari 3 *haplotype* lainnya dan pria azoospermia lebih mungkin berada dalam *haplotype* ini. Demikian juga hasil studi gen *DAZ* (AZFc) pada pria dari lima benua yang mewakili 19 populasi yang berbeda, menunjukkan bahwa sebagian besar pria mempunyai varian gen *DAZ* (Agulnik, 1998).

Kajian yang mendalam terhadap pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan yang merupakan etnis Bali “asli” (*Bali Aga*) dengan tradisi kawin kerabat yang ketat, belum pernah dilakukan apalagi sampai pada level gen, dan hal tersebut perlu dilakukan penelitian. Dengan mengetahui faktor yang diduga terkait dengan penyebab infertilitasnya, maka langkah yang efisien dan efektif dapat dilakukan, yang dampaknya merupakan keuntungan bagi individu pada khususnya dan masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan pada umumnya.

## **1.2. Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, penelitian ini dirancang untuk menjawab beberapa masalah sebagai berikut :

- 1.2.1. Bagaimanakah pola delesi gen *RBM* dan *DAZ* pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat di desa adat Tenganan Pegringsingan?
- 1.2.2. Bagaimanakah pola hormon FSH, LH dan Testosteron pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat di desa adat Tenganan Pegringsingan ?
- 1.2.3. Apakah faktor infeksi *Chlamydia trachomatis* urin terdapat pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat di desa adat Tenganan Pegringsingan ?
- 1.2.4. Bagaimana dinamika penduduk di desa adat Tenganan Pegringsingan yang merupakan masyarakat pelaku kawin kerabat?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan Umum**

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi faktor penyebab infertilitas dari pria pasangan infertil pada kelompok masyarakat yang melakukan kawin kerabat.

#### **1.3.2. Tujuan Khusus**

Secara khusus penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

- 1.3.2.1. Pola delesi gen RBM dan DAZ pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat.
- 1.3.2.2. Pola hormonal (FSH, LH dan Testosteron) dan infeksi *Chlamydia trachomatis* pada pria pasangan infertil pada kelompok masyarakat pelaku kawin kerabat
- 1.3.2.3. Pola demografi masyarakat yang melakukan kawin kerabat

### **1.4. Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1. Bagi Anggota Masyarakat**

- 1.4.1.1. Membantu anggota masyarakat dalam usaha menentukan tidak lanjut penanganan infertilitas pria yang lebih efisien dan efektif
- 1.4.1.2. Mendukung data untuk konsultasi genetik pra-nikah

#### 1.4.2. Bagi Ilmu Pengetahuan

Menambah informasi ilmiah tentang profil delesi gen subregion AZF pada pria pasangan infertil dalam masyarakat yang melakukan kawin kerabat.





# **BAB 2**

# **TINJAUAN PUSTAKA**

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Infertilitas

Pasangan infertil adalah pasangan yang sudah menikah 1 tahun atau lebih, melakukan hubungan seks secara normal tetapi istrinya belum hamil, atau belum mempunyai anak. Infertilitas merupakan masalah bagi sekitar 10% pasangan suami istri yaitu kesulitan mendapatkan anak, yang secara umum terjadi karena penyebab lingkungan (misalnya infeksi, radiasi ataupun zat tertentu) dan atau penyebab genetik. (Hull MGR et al., 1984 & Bhasin et al., 1994).

Penyebab infertilitas bisa karena faktor istri (45%), faktor suami (25%) atau keduanya (20%) dan 10% tidak diketahui penyebabnya (*idiopatik infertility*). Penyebab infertilitas wanita 30% adalah gangguan ovulasi, 75% diantaranya menunjukkan adanya sindroma ovarium polikistik (PCO). (Sudarto, 1997). Diantara tanda dari sindroma polikistik ovarium (PCO) antara lain gangguan menstruasi (*menstrual irregularity*), bahkan tidak menstruasi (*amenore*), dan kegemukan (*obesity*). (Galle PC, 1988).

Penyebab infertilitas pria, sekitar 50% karena gangguan spermatogenesis (Vaessen M., 1984). Kelainan spermatozoa 35 – 40% tidak diketahui penyebabnya (Baker, 1994). Yang paling banyak dikemukakan adalah faktor genetik (Ruiz-Pesini et al, 2000). Delesi daerah eukromatik pada bagian distal kromosom Y diketahui ada hubungan dengan ekstrem oligozoospermia ataupun azoospermia, merupakan faktor genetik yang mempengaruhi spermatogenesis.

Gen *azoospermia factor (AZF)* terletak pada kromosom Y (Yq).(Tiepolo *et al*, 1976).

## 2.2. Nomenklatur dan Abnormalitas Kromosom

Kromosom manusia normal terdiri dari 23 pasang yaitu 22 pasang autosom dan 1 pasang kromosom seks atau sama dengan 46 kromosom (46 XX untuk wanita, dan 46, XY untuk laki-laki). Kelainan yang terjadi bisa berupa perubahan kuantitas yaitu kurang misalnya 45,XO (Turner syndrome); terjadi kelebihan misalnya 47, XXY (Klinefelter's syndrome) ataupun kualitasnya yang berubah yaitu jumlah kromosom tetap 23 pasang tetapi terdapat kromosom yang tidak komplet yang dikenal sebagai aberasi kromosom, antara lain : delesi, translokasi, inversi, duplikasi dan ring.

Kromosom diidentifikasi berdasarkan ukuran, posisi sentromer dan pola *banding*-nya. Berdasarkan ukuran, kromosom manusia dikelompokkan menjadi kelompok A sampai G. Kelompok A meliputi kromosom nomer 1-3 (terbesar, metasentrik, kecuali kromosom 2 submetasentrik), kelompok B meliputi kromosom 4 dan 5 (besar dan submetasentrik), kelompok C meliputi kromosom nomer 6-12 dan kromosom X (ukuran medium, submetasentrik), kelompok D meliputi kromosom nomer 13 -15 (ukuran medium, akrosentrik dengan satelit), kelompok E meliputi kromosom nomer 16 -18 (ukuran kecil, 16 metasentrik sedangkan 17 dan 18 submetasentrik), kelompok F meliputi kromosom nomer 19 dan 20 (kecil, metasentrik), sedangkan kelompok G meliputi kromosom nomer 21, 22 dan kromosom Y (ukuran kecil, akrosentrik, terdapat satelit pada kromosom nomer 21 dan 22 , tidak pada kromosom Y).



Berdasarkan corak (*banding*), terdapat *G-banding* jika dilakukan pewarnaan Giemsa, *Q-banding* pada pewarnaan kromosom dengan bahan fluoresensi quinakrin, *R-banding* yang merupakan reverse dari *G-banding*, *T-banding* merupakan teknik *R-banding* dengan fokus pada telomer, dan *C-banding* yang memberi fokus pada bagian heterokromatin.

Tatacara penamaan (*nomenclature*) kromosom menurut *The International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (1995), lengan pendek disebut p (*petit*) dan lengan panjang disebut q (*queue*). Masing-masing lengan dibagi menjadi beberapa region dan diberi label p1, p2, p3, dst., dan q1, q2, q3, dan seterusnya; yang dihitung dari sentomere menuju distal. *Region* meliputi beberapa band, dan dilabel p11 (satu-satu, bukan sebelas), p12, dan seterusnya.

Nomenklatur untuk abnormalitas kromosom, sebagai berikut: Trisomi (mis. 47,XX,+21), *Mosaics* (mis. 47,XXX/46,XX), Delesi misalnya 46,XY, del (4), (p16.3), Translokasi misalnya 46,XX, t(2;6) (q35;p21.3). (Strachan T., and Read AP., 2001).

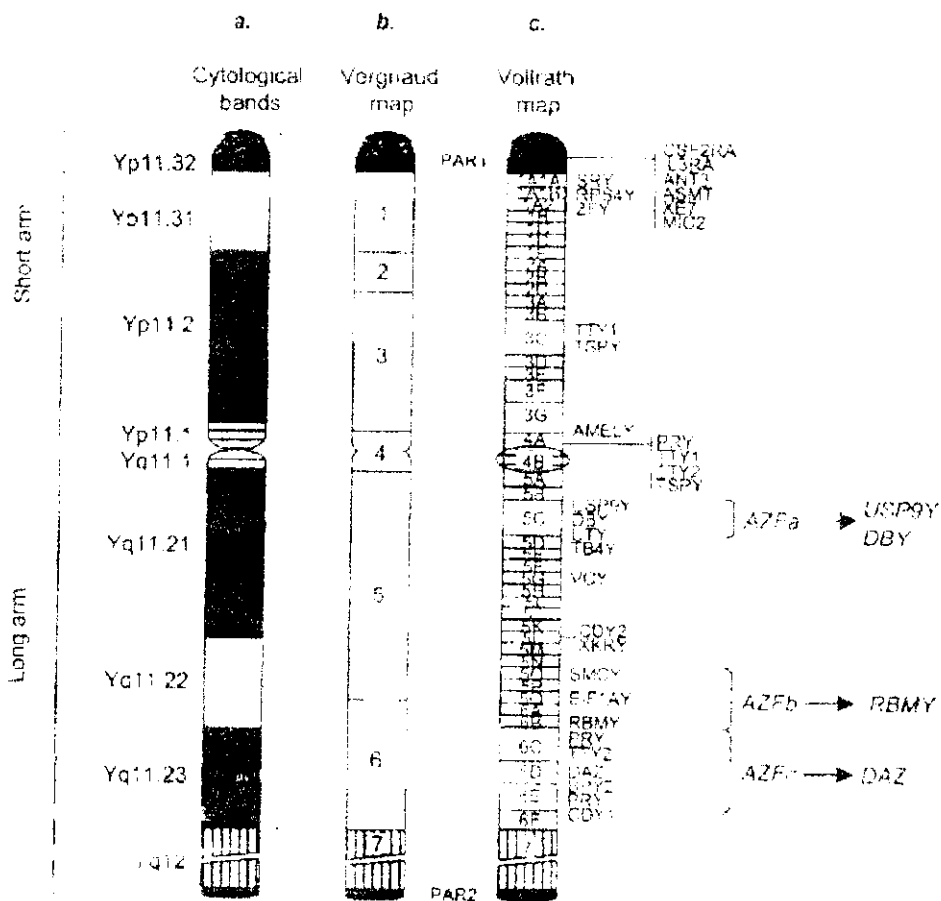
Kromosom Y merupakan kromosom yang paling kecil dalam genom manusia (sekitar 60 Mb), mempunyai tipe akrosentrik dan terdiri dari tiga bagian utama yaitu lengan pendek (Yp), lengan panjang (Yq) dan sentromer yang memisahkan kedua lengan tersebut. Pada bagian ujungnya terletak *region pseudo autosomal (PA Rs)* yang berpasangan dengan kromosom x ketika peristiwa meiosis. Region selain PARs adalah region yang tidak mengalami rekombinasi, disebut *Nonrecombining Region Y (NRY)* dan mengandung beberapa sequens repetitif.

Lengan pendek (Yp) dan bagian proksimal lengan panjang kromosom Y (Yq) ditempati daerah eukromatin, sedangkan bagian distal Yq ditempati daerah

heterokromatin. Panjang region ini bervariasi dan menempati setengah hingga dua pertiga Yq. Dengan demikian lengan panjang kromosom Y secara sitogenetik terbagi menjadi region proksimal eukromatik (Yq11, terdiri dari Yq11.1, 11.21, 11.22, dan 11.23) dan region distal heterokromatik (Yq12), sedangkan lengan pendek eukromatik disebut Yp11 (Krauzs & McElreavey, 1999; Foresta et al., 2001).

Kromosom Y dipetakan menjadi tujuh interval, lengan pendek dan sentromer terdiri dari interval 1-4, dari bagian distal ke proksimal. Bagian eukromatik Yq (lengan panjang) ditempati oleh interval 5 dan 6, dari bagian proksimal ke distal, sedangkan region heterokromatin dinyatakan sebagai interval 7. Interval delesi 5 berkaitan dengan Yq11.21 hingga bagian tengah Yq11.22 dan interval delesi 6 berkaitan dengan bagian tengah Yq11.22 - Yq11.23. Berdasarkan peta ini, Vollrath kemudian mengelompokkan menjadi 43 subinterval dan merupakan peta yang umum digunakan (Foresta et al., 2001).





Gambar 2.1  
Kromosom Y  
Dikutip dari Foresta C. (2001)

### 2.3. Gen subregion AZF

Istilah *azoospermia factor* (AZF) dikenal pertama kali pada tahun 1976 setelah Tiepolo dan Zuffardi menemukan adanya delesi dalam lengan panjang kromosom Y (Yq) pada pria infertil azoospermia. Mereka juga menemukan bahwa ayah dari beberapa pria infertil yang mengalami delesi tersebut memiliki kromosom Y yang normal. Hal ini menunjukkan mutasi yang menyebabkan azoospermia tersebut juga bersifat *de novo* dan mereka menyatakan bahwa suatu faktor genetik yang terdapat

di dalam Yq11 penting untuk perkembangan sel germinal. Gen atau kelompok gen ini dinyatakan sebagai *azoospermia factor (AZF)* (Foresta *et al.*, 2001).

Region AZF ini merupakan region yang luas karena berukuran megabasa (sekitar 10 Mb) dan terdiri dari berbagai gen. Selain itu region ini banyak memiliki sekuen repetitif sehingga mempersulit untuk analisis dan pemetaan (Yen, 1990; Vogt dalam Jansen & Martinez, 1999; Foresta *et al.*, 2001). Delesi dalam region AZF tidak dapat dideteksi pada tingkat sitogenetik tetapi melalui STS-PCR atau *Southern hybridization*. *STS (Sequence-tagged sites)* adalah istilah untuk sequens DNA genom yang dapat diamplifikasi melalui *PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Delesi demikian disebut mikrodelesi (Foresta *et al.*, 2001).

Analisis molekuler terhadap pasien-pasien yang mengalami delesi menunjukkan ada tiga region yang tidak saling tindih (*non overlapping*) dalam interval delesi 5 dan 6 yaitu AZFa, AZFb dan AZFc dari proksimal ke distal Yq. AZFa terletak pada bagian proksimal interval delesi 5 (Subinterval 5 C), berukuran kira-kira 1-3 Mb. AZFb menempati bagian distal interval delesi 5 hingga ujung proksimal interval delesi 6 (subinterval 50-6B), berukuran kira-kira 1-3 Mb, dan AZFc terletak di bagian distal interval delesi 6 (Subinterval 6 C-6E), berukuran kira-kira 1-4 Mb (Vogt *et al.*, 1999 ; Krausz & McElreavey, 1999).

Beberapa gen dalam region AZF diekspresikan dalam testis sehingga dianggap sebagai gen kandidat AZF. Namun demikian berdasarkan analisis pada pasien infertil hanya sedikit gen yang secara nyata bertanggung jawab terhadap fenotip AZF. Gen-gen kandidat AZFb dan AZFc adalah dua gen yang telah dikaji secara mantap pada tahap molekuler, sedangkan gen kandidat AZFa yang baru didemonstrasikan akhir-akhir ini menunjukkan mungkin lebih dari satu gen yang

bertanggung jawab terhadap fenotip AZFa. Namun demikian karakterisasi intervalnya masih dalam penelitian (Lahn & Page, 1998).

Gen-gen kandidat AZFb yang telah dipetakan pada subinterval 506B adalah *EIF1AY* (*essential initiation factor 1A, Y isoform*) dan *RBM* (*RNA binding motif on the Y*). *EIF1AY* menyandi Y isoform dari eIF-1, suatu *initiation factor* translasi yang homolog dengan kromosom x dan diekspresikan dimana-mana. Perannya dalam proses spermatogenesis belum diketahui secara pasti dan tidak ada laporan delesi gen ini secara spesifik. Dengan demikian gen ini tidak dapat dipertimbangkan sebagai gen kandidat AZF walaupun gen ini mempunyai kontribusi terhadap fenotip AZFb.

*RBM* merupakan "family gen", nama awalnya *YRRM* (*Y-specific RNA recognition motif*). *RBM* minimal memiliki enam subfamili (Chaff, 1998), tetapi hanya *RBM1* satu-satunya gen yang ditranskripsikan secara aktif dan *gen copy* yang sangat fungsional terletak pada interval 6B (Elliot *et al.*, 1998). Dengan demikian *RBM* merupakan gen kandidat utama untuk region AZFb dan berfungsi spesifik yaitu pada proses spermatogenesis (Foresta *et al.*, 2001)

Gen *RBM* hanya diekspresikan di *germline* di dalam testis (spermatogonia, spermatisit dan round spermatid). Fungsi nyata *RBM* pada perkembangan sel-sel germinal pria tidak jelas, hal ini karena protein intinya mempunyai modulasi dinamik sesuai dengan lokasinya dalam berbagai sel spermatogonik. Dua fungsi protein *RNA-binding* dalam nukleus yaitu *splicing pre-mRNA*, *packaging* dan membawa RNA yang *mature* (Elliot *et al.*, 1998).

Pada spermatogonia dan spermatisit *RBM*, terdapat juga sementara di tempat tertentu dalam nukleus yang kaya faktor *splicing* (protein SR), sementara pada

*round* spermatid hal ini tidak tampak. *RBM* juga didistribusikan keseluruhan nukleoplasma spermatogonia. Pada tahap spermatosit akhir, faktor *splicing* dilepaskan dari tempat tertentu di nukleus sementara protein SR dikonsentrasikan pada suatu tempat utama dan *RBM* didistribusikan keseluruhan nukleoplasma. Pada *round* spermatid, protein SR terdapat pada suatu tempat utama dan tempat kecil lainnya, juga didistribusikan keseluruhan nukleoplasma. Disini *RBM* tidak ditemukan pada region tertentu nukleus tetapi terdistribusi merata keseluruhan nukleoplasma. (Ruggiu & Cooke, 1999).

*RBMY* dipertimbangkan sebagai gen kandidat utama AZFb karena spesifik pada testis, tidak terdapat pada sebagian pasien infertil dan homolog dengan gen *rbm* tikus, jika terjadi delesi menyebabkan hewan jantan menjadi steril (Mahadevaiah et al., 1998).

Gen *DAZ* merupakan 4 *copy* gen yang hampir identik dan terbagi menjadi 2 *cluster*, masing-masing terdiri dari 2 gen. Delesi subregion AZFc yang dilaporkan sebelum ini meliputi seluruh 4 *copy* tersebut dan semakin banyak *copy* gen yang mengalami delesi semakin besar mengalami masalah fertilitas (Marmar, 2001). *DAZ* diekspresikan dalam spermatogonia, menyandi protein *RNA binding* spesifik testis dan satu-satunya unit transkripsi yang konsisten terjadi delesi pada pria azoospermia secara *de novo* (Reijo et al., 1995; Page, 2002). Produk gen *DAZ* berperan penting dalam *splicing* dan penyimpanan RNA spesifik *germ-line* (Cook et al., 1996). *DAZ* menyandi suatu protein dengan *domain RNA binding* tunggal pada N-terminus dan suatu domain terminal C yang mengandung 7 ulangan unit yang terdiri dari 24 asam amino, sehingga disebut *DAZ repeat* (Ruggiu & Cooke, 1999). Setiap pria mempunyai gen *DAZ* yang bervariasi dalam populasi, tidak

hanya dalam hal jumlah *copy DAZ repeat* tetapi juga pada urutannya (Yen et al., 1999).

Habermann et al. (1998) menemukan protein *DAZ* pada lapisan paling dalam dari epithelium seminiferous dan ekor spermatozoa, hal ini menunjukkan bahwa fungsi protein *DAZ* terjadi dalam metabolisme RNA pada spermatid fase akhir. Mungkin berada pada penyimpanan atau transport mRNA spesifik pada testis, dan translasinya ditahan hingga masa pembentukan sperma yang *mature*. Delesi *DAZ* diduga tidak mengganggu maturasi spermatozoa, tetapi mengakibatkan pengurangan secara gradual spermatozoa *mature* (Seifer et al., 1999).

Kurangnya tekanan evolusi terhadap famili gen *DAZ* kromosom Y pada primata termasuk manusia menunjukkan bahwa gen tersebut berperan terbatas dalam spermatogenesis pria (Agulnik et al., 1998). Suatu hal yang sangat menarik, delesi protein *DAZ* tidak terlibat dalam produksi spermatozoa yang *mature*, walaupun berpengaruh dalam hal rendahnya produksi spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa protein *DAZ* tidak esensial untuk diferensiasi terminal sel germinal tetapi diperlukan untuk fungsi optimalnya (Pearse et al., 1997).

Hasil klon gen *DAZ* dari pria azoospermia yang mengalami delesi gen ini, menunjukkan gen tersebut adalah anggota dari famili multigen yang terdapat lebih dari satu *copy* dalam kromosom Y dan berkelompok dalam region *AZFc*. Dengan demikian gen *DAZ* disebut famili gen *DAZ* (Glaser et al., 1998; Yen, 1998). Struktur gen ini sama dengan gen *RBM1*, menyandi suatu protein dengan satu *domain RNA-binding* tunggal pada N-terminal dan satu *domain C-terminal* yang mengandung *sequen 24* asam amino berulang sehingga disebut *DAZ repeat*. *DAZ*

ditranskripsi dan ditranslasi menjadi protein yang hanya terdapat di sel-sel germinal pria (Habermann *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998; Ferlin *et al.*, 1999).

Walaupun *DAZ* bukan satu-satunya gen yang terdapat pada bagian distal interval 6 Yq, tingginya prevalensi delesi pada pria infertil membuat gen ini menjadi kandidat utama gen *AZFc*. Hal ini didukung oleh homologinya dengan *boule*, gen infertilitas *Drosophila* jantan, apabila mutasi menyebabkan hambatan spermatogenesis (Eberhart *et al.*, 1996).

#### **2.4. Delesi Kromosom Y pada Pria Infertil**

Delesi kromosom Y merupakan salah satu penyebab spesifik infertilitas pria yang paling umum terjadi. Diantara banyak studi yang telah dilakukan, nampak adanya perbedaan prevalensi delesi yang luas yaitu mulai 1 % . (van der Ven *et al.*, 1997) hingga 35 % (Ferlin *et al.*, 1999). Hal ini mencerminkan perbedaan kriteria dalam pemilihan pasien, sehingga kejadian pasti yang secara klinis relevan dengan delesi pada pria infertil masih belum jelas.

Sebagian besar studi delesi pada kromosom Y difokuskan pada pria azoospermia dan ekstrem oligozoospermia. Prevalensi delesi akan meningkat jika dilakukan kriteria seleksi pasien yang lebih ketat.

Prevalensi delesi pada pria oligozoospermia yang tidak diseleksi adalah 2,9%, tetapi pada pria oligozoospermia idiopatik yang diseleksi 11,6 % dan meningkat menjadi 14,3% pada pria ekstrem oligozoospermia idiopatik. Hal yang sama juga terjadi pada pria azoospermia, rata-rata delesi pada pasien yang tidak diseleksi 7,3% tetapi jika hanya idiopatik yang dipilih maka prevalensinya meningkat menjadi 18%. (Foresta *et al.*, 2001).



Berdasarkan struktur testis, prevalensi delesi pada pria ekstrem oligozoospermia idiopatik dengan gambaran testis hypospermatogenesis berat adalah 24,7%, sedangkan prevalensi pada pria azoospermia idiopatik dengan histologi testis *Sertoli Cell-Only Syndrome (SCOS)* adalah 34,5%. Prevalensi delesi pada kondisi jumlah spermatozoa lebih besar dari 5 juta /ml adalah sangat rendah (0,7%), hal ini menunjukkan bahwa delesi kromosom Y sangat menentukan kerusakan produksi spermatozoa. Delesi lebih sering menyebabkan azoospermia (84,3%) dibanding ekstrem oligozoospermia (14,1%) atau moderat oligozoospermia (1,6%) (Foresta *et al.*, 2001).

Sebagian besar delesi yang diamati pada pria infertil terjadi dalam *region AZFc* dan berhubungan dengan azoospermia, oligozoospermia dan juga ekstrem oligozoospermia (Seifer *et al.*, 1999; Cram *et al.*, 2000; Osterlund *et al.*, 2000; Friel *et al.*, 2001; Maurer *et al.*, 2001) bahkan oligoasthenozoospermia (Chiang *et al.*, 2000). Sedangkan pria yang mengalami delesi pada *AZFd* menampilkan oligozoospermia ringan atau bahkan konsentrasi spermatozoa yang normal tetapi morfologi spermatozoa subnormal (Kent-First *et al.*, 1996). Pria dengan delesi *region AZFb* yang lebih luas hingga ke dalam *region AZFa* umumnya menampilkan fenotip histologi hambatan sel germinal atau *Sertoli Cell-Only Syndrome (SCOS)*.

Analisis histologi jaringan testis pria infertil kelompok azoospermia, menunjukkan fase gangguan perkembangan sel germinal yang berbeda. Delesi pada masing-masing region berhubungan dengan keadaan histologis yang berbeda. Delesi yang terjadi pada *AZFa* mengakibatkan *Sertoli Cell Only Syndrome (SCOS)* tipe I (tidak ada spermatogonia), delesi yang terjadi pada *AZFb* mengakibatkan

hambatan spermatogenesis (*Spermatogenic Arrest = SGA*) biasanya pada tahap spermatosit, dan delesi pada *AZFc* berhubungan dengan *SCOS* tipe II (terdapat beberapa spermatogonia dengan spermatogenesis yang terbatas) (Vogt et al., 1996).

Keadaan tersebut menunjukkan bahwa tidak hanya satu gen tetapi *multiple* gen Y menjadi bagian lokus *AZF* kromosom Y, dan gen-gen tersebut berfungsi pada fase yang berbeda selama spermatogenesis manusia (Vogt dalam Jansen & Martiner, 1999). Analisis mutasi-gen, diagnostik terhadap gen-gen kandidat *AZF* kromosom Y menjadi sulit karena gen-gen tersebut bukan *gen single-copy*. Karena itu analisis fungsi famili gen *TSPY*, *RBM* dan *DAZ* akhir-akhir ini dialihkan ke tingkat protein (Ruggiu & Cooke, 1999).

Fenotip steril pada pasien yang mengalami delesi salah satu dari *region AZF* hanya terjadi jika delesi tersebut meliputi keseluruhan *region AZF*, termasuk struktur *sequence repetitive*. *Region AZF* meliputi beberapa blok famili *sequence repetitive*, dan bukti molekuler menunjukkan bahwa keseluruhan *region AZFc* di bagian distal Yq11 berada dalam keadaan duplikasi (Kirsch et al., 1996).

Korelasi antara genotip dan fenotip dalam kasus infertilitas hingga kini belum menunjukkan pola yang pasti, sebagai contoh delesi pada *AZFa* berhubungan dengan ekstrem oligozoospermia hingga azoospermia (Friel et al., 2001; Maurer et al., 2001), sementara pria infertil oligozoospermia juga mengalami delesi pada *AZFb* atau *AZFc* (Pryor et al., 1997; Hoffer et al., 1999; Seifer et al., 1999; Maurer et al., 2001). Bahkan pria oligozoospermia yang mengalami delesi pada *AZFc* dapat mengalami penurunan konsentrasi spermatozoa berubah menjadi azoospermia (Girardi et al., 1997; Osterlund et al., 2000).

Variasi fenotip yang nampak pada pasien yang mengalami delesi pada *AZFb* dan *AZFc* dapat dijelaskan dengan beberapa hipotesis :

1. Perbedaan luas delesi. Delesi dapat meliputi keseluruhan region *AZFb* atau *AZFc*, sebagian atau lebih luas, hanya satu gen atau kelompok gen atau beberapa *marker STS*. Hal ini dapat diduga bahwa delesi yang lebih luas berhubungan dengan fenotip yang lebih parah.
2. Peran gen homolog dan latar belakang genetik. Walaupun tidak ada bukti langsung tentang peran gen-gen tersebut dalam spermatogenesis, kedudukannya dapat merubah ekspresi fenotip pasien yang mengalami delesi kromosom Y. Sebagai contoh *DAZL1/DAZ*, *DAZ* merupakan gen kandidat *AZFc* homolog dengan *DAZL1* gen yang terdapat pada autosom. *DAZL1* diekspresikan dalam gonad dan dengan demikian akan bekerja secara sinergis dengan *DAZ* selama spermatogenesis. Sementara itu latar belakang genetik dapat mempengaruhi fenotip delesi yang terjadi, dan tidak adanya gen *AZF* dapat dikompensasi oleh gen lain dalam kelompoknya dengan cara yang berbeda.
3. Peningkatan kegagalan spermatogenesis. Delesi kromosom Yq dapat menyebabkan peningkatan kerusakan produksi spermatozoa dan pria oligozoospermia dapat menjadi azoospermia seiring dengan berjalannya waktu. (Simoni et al., 1997; Chang et al., 1999; Page et al., 1999).

Korelasi genotip/fenotip akan menjadi lebih jelas apabila dibuat kriteria seleksi pasien yang lebih akurat, investigasi histopatologis dan klinis yang lebih baik serta definisi fenotip yang tepat. Untuk menentukan apakah ada perbedaan populasi diantara frekuensi, posisi dan luasnya delesi diperlukan studi dari

berbagai kelompok pria yang berasal dari etnis atau geografi yang berbeda. (Krausz and McElreavey, 1999).

Walaupun beberapa penemuan nampaknya masih bertentangan, beberapa kecenderungan genotip/fenotip yang umum teramati adalah :

1. Delesi ditemukan hampir selalu terjadi pada pria azoospermia atau ekstrem oligozoospermia
2. Delesi juga ditemukan pada pasien dengan andrologis abnormal
3. Frekuensi delesi Yq lebih tinggi ditemukan pada azoospermia dan infertilitas idiopatik dibanding oligozoospermia dan infertilitas yang sudah diketahui etiologinya
4. Secara umum, delesi yang luas berhubungan dengan kerusakan spermatogenesis yang lebih parah
5. Delesi pada *AZF<sub>a</sub>* kurang umum (1-5 %) dan umumnya berhubungan dengan *SCOS (Sertoli Cell-Only Syndrome)* tipe I
6. Delesi pada *AZF<sub>c</sub>* dan *AZF<sub>c+b</sub>* merupakan delesi yang paling sering dan mungkin berhubungan dengan berbagai kegagalan spermatogenesis yang melibatkan oligozoospermia (Krausz & McElreavey, 1999).

Sebagian besar delesi kromosom Y bersifat *de novo*, yang berarti bahwa delesi terjadi dalam *germ line* seorang ayah. Asal mula delesi nampaknya paling mungkin dalam testis (meiosis atau spermatid) walaupun delesi dapat muncul dalam ovum yang difertilisasi atau embrio. Terjadinya delesi nampaknya sebagai konsekuensi banyaknya elemen *DNA* yang berulang sehingga menyebabkan rekombinasi intrakromosom yang tidak normal (Edward & Bishop, 1997).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa tingginya prevalensi delesi kromosom Y pada pria azoospermia dan ekstrem oligozoospermia berhubungan dengan penyebab lain yaitu *severe testiculopathy* berupa *cryptorchidism* dan atau *varicocele* (Krausz et al., 1999). Hal ini dimungkinkan karena *severe testiculopathies* yang disebabkan oleh delesi kromosom Y mendorong testis menjadi tidak respon terhadap stimulus normal yang mengatur turunnya testis. Penderita *cryptorchidism unilateral* yang mengalami *testiculopathy bilateral* berhubungan dengan delesi kromosom Y dan bukan berhubungan dengan lokasi tidak normalnya testis (Moro et al, 2000).

Dari sudut pandang klinis, kadar hormon dan volume testis pada penderita yang mengalami delesi kromosom Y menunjukkan *severe testiculopathies* yang hanya melibatkan sistim spermatogenesis. Kenyataannya, secara umum ukuran testis berkurang, konsentrasi FSH tinggi, kadar LH dan testosteron plasma dalam batas normal. Sebagian besar studi melaporkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna dalam hal volume testis dan kadar FSH diantara pasien-pasien yang mengalami *severe testiculopathies* dengan atau tanpa delesi kromosom Y (Foresta et al., 2001).

## **2.5. *Chlamydia trachomatis***

Merupakan mikroorganisme yang eksklusif patogen pada manusia. Terdapat 15 varian yaitu A, B, Ba, dan C yang menyebabkan trakoma; sedangkan varian D, E, F, G, H, I, J dan K adalah jenis yang menginfeksi sistim genitalia.

*Chlamydia trachomatis* memiliki dinding sel dan membran sel seperti bakteri gram negatif, tetapi terdapat perbedaan yang spesifik yaitu dalam siklus

pertumbuhannya. Terdapat 2 bentuk dari mikroorganisme ini, *elementary body (EB)* yang adaptif terhadap lingkungan ekstraseluler, dan *reticulate body (RB)* yang adaptif terhadap lingkungan intraseluler. *EB* ini merupakan bentukan bulat dengan ukuran 300 nm yang sangat infeksius. Setelah melekat pada sel, kemudian *EB* secara aktif masuk menembus dinding sel dan berada didalam kantong phagosit. *EB* mengadakan diferensiasi, menjadi lebih besar, berbentuk kokoid yaitu *RB* dengan ukuran 800 – 1000 nm. Selanjutnya akan bermultiplikasi secara cepat, sehingga dalam waktu 48 – 72 jam akan menjadi ratusan sampai ribuan bentukan baru yang merusak sel *host*. (Todd WJ., Caldwell HD., 1985)

Infeksi *Chlamydia trachomatis* pada organ reproduksi merupakan infeksi yang ditularkan melalui hubungan seksual, dan infeksi ini dapat memberi dampak yang kurang menguntungkan terhadap kesuburan individu (Miettinen A., et al., 1989). Terdapat kecenderungan peningkatan kejadian infeksi *Chlamydia trachomatis* pada pria (3-8%), sebagian besar tanpa gejala atau tanpa keluhan (84%), namun potensial menyebabkan gangguan berupa penurunan kualitas sperma bahkan sampai dengan terjadinya infertilitas. Infeksi pada organ reproduksi merupakan penyebab kedua, setelah varikokel, yang menyebabkan kualitas sperma semakin jelek. Diantara beberapa jenis infeksi, *Chlamydia trachomatis* menempati porsi yang bermakna (Stamm WE, 1984; Groseclose SL., 1996; Boyer CB., 1999; Park RP., 2000).

## 2.6. Perkawinan Kerabat

Perkawinan kerabat adalah perkawinan yang terjadi antar individu yang masih terdapat kekerabatan (*related*). Individu yang memiliki kekerabatan

(*related individuals*) mempunyai nenek moyang atau leluhur (*ancestors*) yang sama dalam pedigri. Nenek moyang/leluhur yang sama (*common ancestor*), dapat berarti orang tuanya sama, kakek-nenek sama, dan sebagainya; dan tidak harus dari generasi yang sama. Terdapat istilah Derajat perkawinan kerabat (*the degree of inbreeding*) dan Koefisien perkawinan kerabat (*the coefficient of inbreeding*).

Derajat perkawinan kerabat (*the degree of inbreeding*) didefinisikan sebagai probabilitas terjadinya homosigot identik pada satu lokus. Derajat perkawinan kerabat lazimnya diberi simbol  $F$ , dengan nilai antara 0 dan 1. Derajat perkawinan kerabat antar individu yang tidak ada unsur kekerabatan adalah 0 (nol). Derajat perkawinan kerabat antar saudara kandung adalah 25% ( $A_1A_2 \times A_3A_4$ , terdapat 4 kemungkinan homosigot dari 16 kemungkinan yang ada). Derajat kekerabatan aditif (*the degree of additive relationship*) antara 2 individu adalah kemungkinan terdapat gen identik pada satu lokus yang terjadi karena 2 gen dipilih secara random sebagai akibat kawin kerabat. Derajat perkawinan kerabat individu (*the degree of individual inbreeding*) tersusun setengah dari derajat kekerabatan ayah dan setengah dari derajat kekerabatan ibu. Tingkat kekerabatan dan kawin kerabat (*the degree of relationship and inbreeding*) juga disebut Koefisien kekerabatan dan kawin kerabat (*the coefficient of relationship and inbreeding*).

Penghitungan Koefisien kekerabatan (*coefficient of relationships = A*) dihitung melalui tahapan kemungkinan hubungan antara kedua orang-tua sampai dengan leluhur yang sama. (Christensen K., 2002).

$$A = \sum \frac{1}{2}^n \times (1 + Fa)$$

n = tahapan ke leluhur

A = Koefisien kekerabatan aditif

Pada perkawinan kerabat, terdapat kemungkinan 2 gen identik bertemu karena faktor leluhur yang sama. Hal tersebut dapat berarti jelek ataupun baik. *Progressive Retinal Atrophy (PRA)* akan manifes terjadi kebutaan yang sifatnya progresif karena bertemunya gen resesif menjadi homosigot.

Pada hewan, dengan didapatkannya ciri-ciri homosigot yang didapat dari inbreed akan memudahkan jika diperlukan pencangkokan organ (*organ graft*) karena faktor kesamaan genetik. Namun demikian masalah hilangnya kesuburan akan nampak dalam 8 sampai 12 generasi.

## 2.7. Hasil Penelitian Pendahuluan

### 2.7.1. Lokasi dan Struktur desa Tenganan Pegringsingan

Desa adat Tenganan Pegringsingan di Kecamatan Manggis, Kabupaten Karangasem, Propinsi Bali; terletak 65 km ke arah timur dari kota Denpasar. Daerah tersebut berjarak 3 km dari laut dan terletak 40 meter diatas permukaan laut, lokasinya pada lembah yang dikelilingi bukit.

Luas wilayah desa sekitar 115 ha, yang sebagian besar berupa tanah tegalan dan sawah. Produksi pokok dari hasil pertanian adalah padi dan jagung, seta kelapa dari hasil tegalan. Beberapa ternak antara lain kerbau (dikeramatkan, berkeliaran di desa), sapi (berada di luar desa), babi (di belakang rumah) serta ayam jantan untuk aduan. Sejak tahun 1970-an, daerah ini menjadi daerah pariwisata; dan hal ini mempengaruhi pola hidup warga.



Tenganan Pegringsingan merupakan daerah “Bali asli” (*Bali Aga*), dengan kultur kebersamaan, mengetrapkan pemangku adat, yang merupakan keturunan kasta triwangsa.

Yang menarik dari desa ini antara lain, bentuk desa segi empat dengan panjang 500 meter dan lebar 250 meter. Daerah tersebut dibagi oleh 3 jalan yang paralel, yang diantara jalan tersebut terdapat deretan perumahan, sehingga terdapat 3 deretan rumah, yang sebelah barat adalah Banjar Kauh, yang tengah adalah Banjar Tengah dan yang disisi timur adalah Banjar Pande.

Masyarakat di Banjar Kauh dan Banjar Tengah ini yang disebut desa adat Tenganan Pegringsingan, khusus untuk mereka yang sangat kukuh memegang adat desa. Bagi yang ada masalah (pelanggaran adat), mereka berada di Banjar Pande. Namun demikian mereka hidup sebagai satu kesatuan yang harmonis.

### **2.7.2. Perkawinan di desa adat Tenganan Pegringsingan**

Data tentang perkawinan endogami, tahun 1876 – 1925 sebesar 98%, tahun 1925 – 1978 sebesar 92%, sedangkan tahun 1978 – 1994 terdapat 69%. (Breguet G., 1995). Pada periode 2001-2004 terdapat 57% (9 diantara 16) melakukan perkawinan endogami. Semua yang melakukan perkawinan endogami, ternyata juga kawin kerabat. Penurunan jumlah perkawinan endogami antar waktu, menunjukkan bahwa faktor keterbukaan populasi karena mudahnya transportasi dan globalisasi informasi memberi peran yang berarti (Glinka J., 2005)

Meskipun aturan desa mengharuskan perkawinan antar warga desa sendiri, namun perkawinan antar saudara sepupu, serta paman atau bibi kepada keponakan merupakan larangan (*awig-awig*). Hal ini dilakukan sangat ketat di desa adat

Tenganan Pegringsingan (Banjar Kauh dan Banjar Tengah), tetapi tidak demikian di Banjar Pande. Jika ada warga desa Tenganan Pegringsingan menikah dengan orang luar desa, untuk laki-laki boleh tetap tinggal di desa adat tetapi tidak dapat menjadi klianng desa adat, sebaliknya jika wanita menikah dengan warga di luar desa adat maka untuk seterusnya hak-haknya akan hilang, termasuk untuk bisa tinggal di desa adat. Bagi yang mengikuti peraturan, pasangan baru akan mendapat fasilitas rumah serta ladang. Poligami juga merupakan larangan bagi warga desa Tenganan Pegringsingan, namun janda bebas untuk menikah lagi.

### **2.7.3. Demografi desa adat Tenganan Pegringsingan**

Data jumlah penduduk di Tenganan Pegringsingan pada tahun 1926 adalah 415 jiwa. Terhitung sejak 1926 sampai 31 Desember 1963 (16 tahun) terjadi penurunan jumlah penduduk sampai 33% (minus 138 jiwa). Tahun 1963 sampai 1978, jumlah penduduk relatif stabil, bertambah 5% (dari 277 menjadi 291). Sejak 1979 sampai 1994, bertambah 9% (dari 291 jiwa menjadi 317 jiwa) (Breguet, 1995). Sampai akhir desember 2004 terdapat 309 jiwa.

Puncak terbanyak jumlah penduduk adalah sekitar tahun 1885 yaitu sekitar 450 jiwa.

Fertilitas dari tahun ke tahun cenderung menurun, *selected fertility rate* (jumlah total kelahiran dalam 1 tahun/jumlah wanita usia 20 tahun – 34 tahun) 0,97 pada tahun 1963 –1966, tahun 1975-1978 menjadi 0,56 dan tahun 1991-1994 menjadi 0,51 (Breguet, 1995). Pada tahun 2001 – 2004 laju fertilitas selektif sebesar 0,47. *Global fertility rate* (jumlah total kelahiran dalam 1 tahun/jumlah wanita umur 15 tahun – 49 tahun) adalah 0,44 pada tahun 1963 – 1966, pada

tahun 1975 –1978 menjadi 0,23 dan pada tahun 1991 – 1994 menjadi 0,26. Laju fertilitas global tahun 2001 – 2004 sebesar 0,20.

Data tahun 1979 – 1985 menunjukkan bahwa angka kematian anak bawah lima tahun (balita) relatif sedikit, bahkan sebagian besar meninggal pada umur diatas 60 tahun dengan sebab kematian yang beragam, mulai dari penyakit infeksi (tuberkulosa paru, gastro enteritis dan typhus) sampai dengan penyakit metabolit degeneratif (diabetes melitus dan keganasan).

Dalam kurun waktu 2001 – 2004 terdapat 11 (sebelas) orang meninggal dunia, dan keseluruhan meninggal pada umur di atas 60 tahun. Sebab kematian, disamping karena faktor usia, penyakit saluran napas (1 orang karena TBC dan 2 orang karena asma), juga kencing manis.

Studi pendahuluan beberapa penyakit di desa adat Tenganan Pegringsingan, antara lain :

- Penyakit Diabetes mellitus (DM) didapatkan prevalensi 10% (Winarso H., 2004), angka tersebut menunjukkan tidak terdapat perbedaan prevalensi DM dengan masyarakat yang tidak melakukan kawin kerabat.
- Bengkak sendi, pada evaluasi terhadap 10 pria (rentang usia 31 th sampai 80 tahun), didapat 50% memiliki kadar asam urat tinggi ( $> 9$  mg/dL), faktor rheumatoid 100% negatif, dan *hs-CRP* (*C-reactive protein*) 10% positif (Winarso H., 2004). Analisa tentang hal ini menunjukkan bahwa faktor penyebab dominan dari bengkak sendi karena kadar asam urat yang tinggi. Tradisi minum tuak yang berlebih dilakukan oleh hampir setiap pria di desa ini, ikut berperan menyebabkan kadar asam urat darah tinggi

karena tuak yang mengandung alkohol akan menyebabkan ekskresi asam urat lewat ginjal dihambat.

- Penelitian lokus *HLA* antigen yang dilakukan Breguet (1982) terdapat perbedaan antara *HLA* antigen masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan terhadap orang Bali di luar desa adat Tenganan. Terhadap tipe hemoglobin dan isoenzim ditemukan bahwa terdapat 18 orang memiliki laktat dehidrogenase varian *calcuta-1*, hal tersebut menunjukkan adanya migrasi dari India. Dari jumlahnya yang tidak banyak, fakta tersebut dapat disebut *gen flow*.

Sejarah desa adat Tenganan Pegringsingan terdapat beberapa versi, salah satunya menyebutkan bahwa mereka merupakan keturunan orang desa Aga yaitu suatu daerah di kaki gunung raung Jawa timur. Agama hindu aliran Indra merupakan paham masyarakat disini, yang berbeda dengan hindu yang dianut orang Bali pada umumnya. Indra sendiri adalah dewa perang sehingga struktur desa Tenganan Pegringsingan seperti benteng, dengan adat-istiadat dan budaya serta upacaranya terdapat unsur perang dan pertahanan diri (Tim Tata Ruang, 2001).



# **BAB 3**

# **KERANGKA KONSEPTUAL**

# **PENELITIAN**

## BAB 3

### KERANGKA KONSEPSUAL PENELITIAN

#### 3.1. Kerangka Konseptual Penelitian

Abnormalitas konsentrasi spermatozoa idiopatik diduga karena adanya delesi pada lengan panjang kromosom Y (Yq11) pada region AZF (*Azoospermia factor*) yang terdiri dari AZFa, AZFb dan AZFc (Vogt, 1999; Kent-First et al., 1999; Cram et al., 2000).

Mikrodelesi pada kromosom-Y terjadi secara *denovo* (Stuppia et al., 1996), dan akan diwariskan dari ayah kepada anak laki-lakinya (Vogt et al., 1996; Pryor et al., 1997). Infertilitas karena delesi gen *DAZ* kemungkinan terjadi lama sebelum masa puber atau bahkan terjadi saat masa perkembangan embrio (Reijo RA et al., 2000).

Pada kelompok masyarakat dengan tradisi kawin kerabat yang ketat akan memungkinkan terjadi peningkatan infertilitas pria karena penyebab mikrodelesi kromosom-Y, sehingga populasi tidak berkembang atau bahkan terjadi penurunan (*inbreeding depression*). *Inbreeding depression* yang berkelanjutan memberi kemungkinan populasi semakin berkurang. *Endogami* tidak selalu berarti negatif, infertilitas yang terjadi menyebabkan gen yang kurang baik tidak diteruskan ke generasi selanjutnya. Fakta memang populasi terjadi penurunan secara kuantitas tetapi yang *survive* adalah individu yang memiliki kualitas genetik yang lebih baik. Jika yang *fit* mempunyai jumlah anak yang banyak maka populasi akan terjadi penambahan jumlah kembali.

Infertilitas tidak hanya karena faktor genetik tetapi dapat juga karena faktor infeksi antara lain *Chlamydia trachomatis* (Stamm WE., et al., 1984). Infeksi yang terjadi akan menyebabkan obstruksi vasa deferens ataupun rusaknya *blood testis barrier* sehingga terjadi reaksi autoimun berupa munculnya antibodi terhadap spermatozoa. Obstruksi akan mengganggu konsentrasi spermatozoa atau bahkan bisa terjadi azoospermia jika obstruksinya total pada kedua sisi vasa deferens, sedangkan antibodi terhadap spermatozoa akan menyebabkan gangguan aglutinasi spermatozoa sehingga fungsi migrasi spermatozoa akan terganggu.

Faktor hormonal juga dapat menyebabkan infertilitas karena terjadi penurunan kualitas sperma, FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) abnormal atau kadar hormon testosteron yang rendah. Kualitas sperma yang subnormal dengan FSH yang tinggi, memberi makna adanya kegagalan pada fungsi testis yaitu spermatogenesis yang bermasalah. Hal tersebut dapat terjadi karena faktor genetik ataupun non genetik misalnya infeksi, trauma atau gangguan testis lainnya.

Kualitas sperma yang subnormal dengan penyebab FSH rendah ataupun Testosteron rendah memberi pengertian fungsi kelenjar hipofise yang sub normal.

Testosteron yang rendah akan mengganggu spermatogenesis, lebih khusus lagi spermiogenesis yaitu perkembangan dari spermatid menjadi spermatozoa. Manifestasi gangguan yang terjadi berupa peningkatan abnormalitas morfologi spermatozoa, yang selanjutnya akan menyebabkan motilitas spermatozoa kurang baik.

Sampai saat ini belum ada pola yang konsisten hubungan antara lokasi delesi subregion AZF terhadap jenis dan derajat gangguan kualitas sperma (Reijo et al., 1995). Delesi pada AZF-a dan AZF-b kemungkinan memberi manifestasi

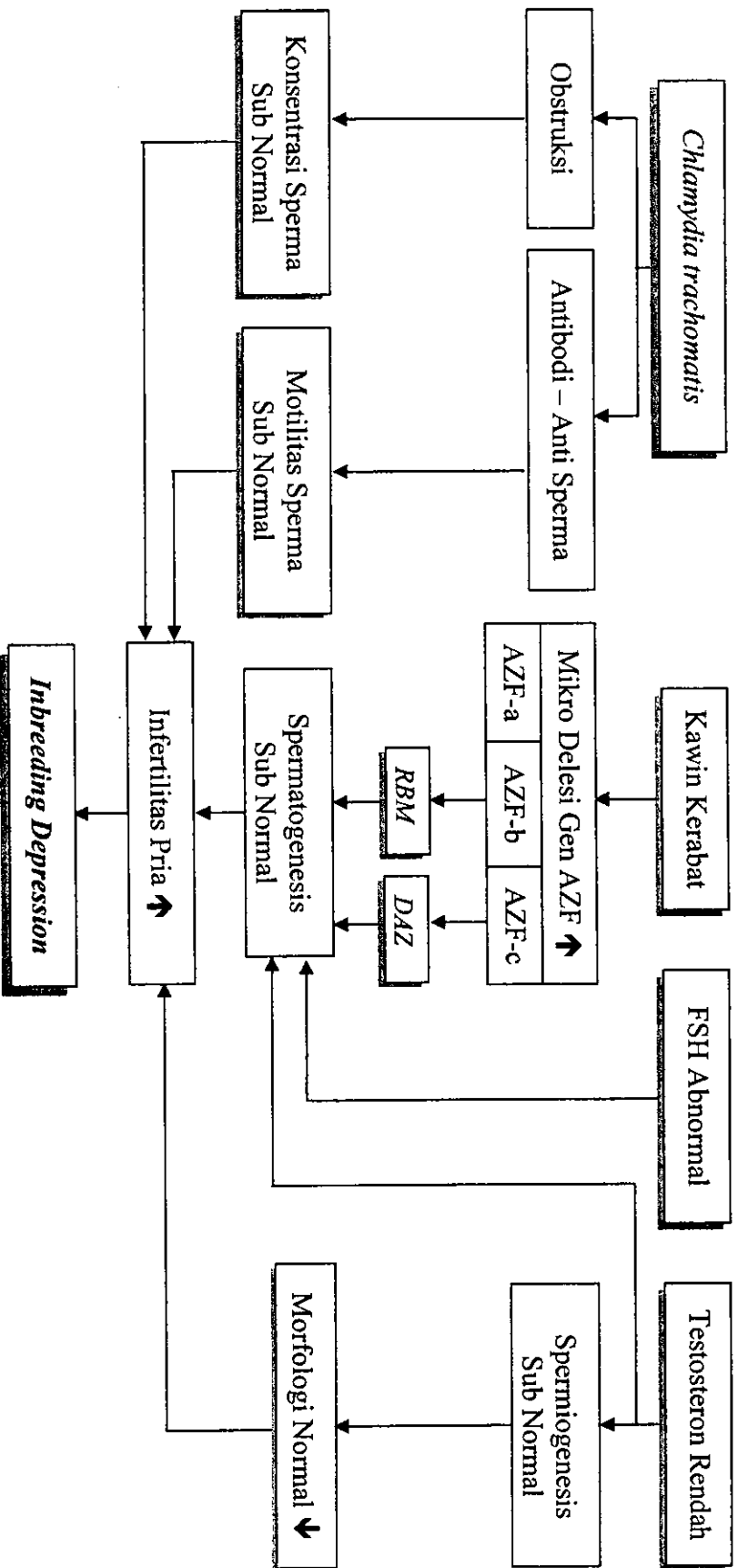
azoospermia, delesi pada AZF-c mungkin memberi manifestasi azoospermia ataupun oligozoospermia berat (*severe oligozoospermia*) (Vogt et al., 1996). Reijo (1996) bahwa delesi pada region AZF-c bisa memberi manifestasi gangguan pada sel sertoli (*Sertoli cell-only*) ataupun oligozoospermia.

Dengan mengetahui kondisi delesi gen *RBM* (*subregion AZF-b*) dan gen *DAZ* (*subregion AZF-c*) pada pria pasangan infertil di kelompok masyarakat yang melakukan kawin kerabat, diharapkan dapat memberi analisa penyebab infertilitas dalam kaitannya dengan tradisi kawin kerabat. Data tersebut akan bermanfaat dalam membantu mengarahkan tindakan lebih lanjut menuju penatalaksanaan yang efisien dan efektif.





3.2. Bagan Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :  
 □ = Diteliti  
 AZF = Azoospermic Factor  
 RBM = RNA Binding Motif  
 DAZ = Deleted in Azoospermia

Bagan : Kerangka Konsep Penelitian



**BAB 4**  
**METODE PENELITIAN**

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian observasional eksploratif.

Penentuan pasangan infertil didapat dari data kependudukan desa dan informasi dari petugas kantor desa, kemudian dilakukan konfirmasi dengan cara mendatangi tempat tinggal subyek. Uji laboratoris terhadap kemungkinan penyebab infertilitas yang dilakukan evaluasi antara lain : faktor hormonal (FSH, LH dan Testosteron), infeksi *Chlamydia trachomatis*, serta penentuan delesi gen subregion AZF yaitu *RBM* dan *DAZ*.

#### 4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini adalah pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan yang mengalami infertilitas dan dalam perkawinannya terdapat unsur kawin kerabat. Penentuan subyek penelitian didapat dengan cara Survey.

Kriteria sampel sebagai berikut :

- 4.2.1. Pria pasangan infertil adalah pria dari pasangan yang mengalami infertilitas, baik infertilitas primer maupun sekunder
- 4.2.2. Infertilitas primer adalah pasangan yang sudah menikah selama 1 tahun atau lebih, melakukan hubungan seks normal tetapi istrinya belum pernah mendapatkan kehamilan. Infertilitas sekunder jika pasangan sudah

mempunyai anak, dan lebih dari satu tahun ingin tambah anak tetapi belum mendapatkan lagi.

- 4.2.3. Kawin kerabat yaitu jika antara suami dan istri terdapat kekerabatan. Kekerabatan yang dimaksud adalah jika pasangan mempunyai kakek nenek yang sama.

#### **4.3. Variabel Penelitian**

- 4.3.1. Variabel *independent*: lokasi delesi dalam subregion AZF (*STS-RBM* dan *STS-DAZ*)
- 4.3.2. Variabel *dependent* : kadar hormon FSH, LH dan Testosteron darah, serta infeksi *Chlamydia trachomatis* urin.

#### **4.4. Alat dan Bahan Penelitian**

- 4.4.1. Untuk penampungan urin digunakan urin pagi hari, pancaran awal (*first void urine*) sebanyak 15 ml yang ditampung dalam kontainer steril
- 4.4.2 Untuk pengambilan darah digunakan *disposable syringe* dan *vacutainer*, dan pengambilan darah dilakukan pagi hari sebelum jam 10 untuk keperluan uji hormonal
- 4.4.3. Untuk isolasi DNA digunakan sentrifuge, inkubator, vortex, micropipet, tube Eppendorf 1,5 ml, Blue tips, spectrophotometer UV(Shimadzu UV-1601), sampel darah dan kit untuk isolasi DNA (metoda TRIZOL)
- 4.4.4. Untuk analisis delesi digunakan mesin PCR GeneAmp 9700, *chamber running* elektroforesis, tube PCR, photo Polaroid, DNA sampel, PCR

Mix, primer DNA, nuclease free water, agarose, TBE buffer 0,5 X dan Ethidium bromide.

Adapun sekuen *primer* untuk masing-masing lokus yaitu :

*SRY* – F : 5' - GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA – 3'

R : 5' – GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG – 3'

([WWW.emqn.org/ychrom.htm](http://WWW.emqn.org/ychrom.htm))

*RBM* - F : 5' - ATG CAC TTC AGA GAT ACG G – 3'

R : 5' - AGT AAC TCT CCC AAC TTC TGC - 3'

(*Locus HSU36218, Accession U36218, 1-468 bp*)

*DAZ* - F : 5' - GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA - 3'

R : 5' - GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C -3'

(*Locus NM\_004081, Accession NM\_004081, 1 –3836 bp*)

#### 4.5. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di desa adat Tenganan Pegringsingan (Banjar Kauh dan Banjar Tengah), Kabupaten Karangasem Propinsi Bali.

Uji hormonal dilakukan di Laboratorium swasta di Surabaya dan Uji gen *RBM* dan *DAZ* di laboratorium biologi molekuler *Tropical Disease Center (TDC)* Universitas Airlangga.

#### 4.6. Prosedur Pengambilan Data

##### 4.6.1. Penentuan Subyek, kuesioner dan pemeriksaan

Yang termasuk dalam penelitian ini adalah pria pasangan infertil yang bertempat tinggal di desa adat Tenganan Pegringsingan.

Kepada pasangan suami istri ditanyakan tentang : riwayat kekerabatan perkawinan, dan frekwensi hubungan seks.

Pada suami dilakukan pengambilan darah tepi untuk pemeriksaan : *Chlamydia* IgG dan IgM, uji hormonal (FSH, LH dan Testosteron), serta analisis delesi gen subregion AZF.

Juga dilakukan penanpungan urin untuk deteksi *Chlamydia trachomatis*.

Analisis sperma dilakukan untuk pemeriksaan parameter sperma.

#### 4.6.2. Analisis sperma

- a. Volume sperma diukur dengan menggunakan gelas ukur. Volume sperma dikatakan normal apabila berukuran  $\geq 2$  ml
- b. pH sperma diukur dengan menggunakan kertas pH range 6,4 – 8,4  
pH semen dikatakan normal apabila menunjukkan PH 7,2 – 7,8
- c. Konsentrasi spermatozoa dihitung dengan menggunakan kamar hitung dari Markler, dengan cara sperma (dikeluarkan dan diencerkan sesuai prosedur standart) diteteskan pada kamar hitung dengan tebal 10  $\mu\text{m}$ . Spermatozoa yang tampak pada kolom/kotak dihitung untuk dikonversikan kedalam konsentrasi juta / ml ejakulat.

##### Klassifikasi konsentrasi spermatozoa

- Normal: apabila berjumlah  $\geq 20$  juta /ml.
- Oligozoospermia : apabila berjumlah 5-20 juta / ml
- Ekstrem oligozoospermia : apabila berjumlah  $< 5$  juta / ml
- Azoospermia : apabila ejakulat tidak mengandung spermatozoa

d. Motilitas spermatozoa dihitung dengan cara : sperma volume 10-15  $\mu$ l diteteskan pada kaca obyek dan ditutup, kemudian diperiksa dengan pembesaran 400-600 kali dibawah mikroskop cahaya.

Klasifikasi motilitas spermatozoa :

- a = spermatozoa bergerak cepat dan lurus ke depan
- b = spermatozoa bergerak lambat atau sulit maju lurus
- c = spermatozoa bergerak ditempat
- d = spermatozoa tidak bergerak

Motilitas spermatozoa dikatakan baik jika minimal 50% spermatozoa bergerak maju (kategori a dan b) atau bergerak cepat lurus ke depan (a saja)  $\geq$  25%

e. Morfologi spermatozoa dihitung dengan cara satu tetes semen dengan volume 10-15 mikroliter dibuat preparat hapusan pada kaca obyek, dikeringkan diudara kemudian dilakukan pengecatan (Methanol, Safranin, Buffer, Kristal violet). Pemeriksaan morfologi dilakukan dibawah miroskop dengan *oil immersion* dan diamati dengan pembesaran 1000 kali.

Spermatozoa normal yaitu spermatozoa dengan kepala berbentuk oval, leher baik dan ekor lurus. Spermatozoa dikatakan berkualitas morfologi baik jika > 50 % spermatozoa mempunyai bentuk normal.

#### 4.6.3. Pengukuran kadar hormon

a. Serum darah sebanyak 200  $\mu$ l direaksikan dengan reagen khusus untuk hormon dalam Strip Reagen Vidas

- b. Kemudian dimasukkan ke dalam alat Mini Vidas Operation Manual selama 40 menit.
- c. Hasil yang dikeluarkan alat tersebut berupa *print out* yang menunjukkan kadar hormon yang ditest.

#### **4.6.4. Teknik *ELISA* (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) untuk deteksi Anti Ig-G Chlamydia dan Anti Ig-M Chlamydia**

##### **Prinsip kerja:**

Serum sampel yang telah diencerkan ditambahkan ke dalam *well* yang telah dilapisi antigen yang dimurnikan. Jika terdapat antibodi Ig-M atau antibodi Ig-G yang spesifik, akan melekat ke antigen. Untuk menghilangkan semua material yang tidak melekat, dilakukan pencucian, kemudian ditambahkan enzim konjugat berlebih dan ditambahkan substrat. Inkubasi akan menyebabkan terjadi hidrolisis dari substrat oleh enzim. Intensitas warna yang terbentuk sebanding dengan banyaknya antibodi dalam sampel.

##### **Langkah kerja :**

1. Tambahkan 10 $\mu$ l serum ke dalam tabung yang telah berisi 200  $\mu$ l sampel diluent, dicampur sampai rata
2. Pindahkan 100  $\mu$ l sampel yang telah diencerkan ke dalam sumuran
3. Untuk kontrol positif, kontrol negatif, kalibrator tanpa pengenceran; pipet 100  $\mu$ l dan masukkan masing-masing ke dalam sumuran
4. Tutup dan inkubasi 20 menit pada suhu kamar
5. Dicuci dengan larutan pencuci sebanyak 3 kali



6. Tambahkan 100  $\mu$ l enzym conjugate pada masing-masing sumuran
7. Tutup dan inkubasi pada suhu kamar selama 20 menit, kemudian cuci dengan larutan pencuci sebanyak 3 kali
8. Tambahkan 100  $\mu$ l larutan substrat ke dalam masing-masing sumuran
9. Tutup dan inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit
10. Tambahkan 100  $\mu$ l *stopping solution*
11. Pembacaan dengan mikro *ELISA reader* pada panjang gelombang 450 nm dan 630 nm

#### **4.6.5. Deteksi *Chlamydia trachomatis* dengan PCR**

##### **Isolasi DNA (Roche)**

0,5 ml bufer ditambahkan kedalam 0,5 ml urin, dalam tabung 1,5 ml. Campuran diinkubasi 37°C selama 15 menit, kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 g selama 5 menit pada suhu kamar. Supernatan dibuang, endapan diresuspensi dengan 0,25 ml lisis bufer, divortek dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Kemudian ditambahkan sebanyak 0,25 ml spesimen ditambah sejumlah yang sama pengencer setelah inkubasi. Tabung divortek, kemudian disentrifus dengan kecepatan 14.000 g selama 10 menit. Diambil 50 mikroliter supernatan, dimasukkan ke dalam tabung amplifikasi yang telah terisi larutan amplifikasi. Selanjutnya dilakukan amplifikasi dengan PCR sesuai prosedur.

##### **Prosedur PCR**

DNA 8  $\mu$ l dimasukkan dalam total volume PCR *mixture* 100  $\mu$ l. Primer: endogenous plasmid *Chlamydia trachomatis*: T1:GGA CAA ATC GTA TCT

CGG dan T2: GAA ACC AAC TCT ACG CTG. PCR *mixture*: 50 mM KCl, 10 mM Tris – HCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM *deoxynucleoside triphosphate*, 50 pmol masing-masing *primer*, 0.1 mg gelatin per ml, 0.2 U *Taq DNA polymerase*.

Preinkubasi 5 menit 94°C, denaturasi DNA, Amplifikasi 40 siklus: 94°C 1 menit, 55°C 1 menit, dan 74°C 2 menit, kemudian setelah siklus dielongasi secara lengkap pada 74°C selama 3 menit.

Deteksi DNA hasil PCR: 40 μl hasil PCR dianalisis pada gel agarose 1.5% electrophoresis (16).

#### **4.6.5. Isolasi DNA dari darah perifer untuk penentuan gen *RBM* dan *DAZ***

DNA diisolasi menggunakan metoda TRIZOL, dengan cara sebagai berikut :

- a. Sebanyak 1 mL TRIZOL ditambah 0,5 mL darah dengan EDTA divortex sampai homogen selama 5 menit, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar
- b. Ditambahkan 0,2 mL khloroform, kemudian divortex dan dilakukan inkubasi selama 3 menit
- c. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4° C
- d. Fase bagian atas diambil kemudian dipindahkan ke dalam tabung ependorf steril
- e. Ditambahkan 0,5 mL isopropanol, dibolak-balik secara perlahan, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar

- f. Dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 16.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4° C
- g. Supernatan dibuang
- h. Pelet dicuci 2 kali menggunakan alkohol 70%
- i. Pelet dilakukan pelarutan dengan cara menambahkan *deionized water* sebanyak 50 µL, divortex, kemudian diinkubasi dalam suhu - 20° C.

Kemurnian dan konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan spektrophotometer UV. Kemurnian DNA dihitung dari ratio  $\lambda$  260 :  $\lambda$  280, sedangkan konsentrasi DNA (µg/ml) dihitung dari perkalian  $\lambda$  260 x faktor pengenceran x 50 (konstanta dimana 260 nm suatu larutan dengan nilai absorbansi 1,0 sebanding dengan 50 µg DNA rantai ganda per ml).

#### 4.6.6. Amplifikasi DNA dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

PCR mix (terdiri dari PCR buffer, Taq polymerase, dNTP dan MgCl<sub>2</sub>) sebanyak 12,5 µl dimasukkan dalam tube Eppendorf, kemudian ditambah satu pasang primer masing-masing 2,5 µl (konsentrasi primer = 12,5 pmol/100 µl), sampel DNA dan aquabidest steril sehingga volume akhir campuran reaksi total 25 µl.

Campuran divortex sebentar, *spindown* dan diamplifikasi dalam Thermal - cycler PE 9700.

Kondisi amplifikasi untuk masing-masing primer adalah :

- 1) Untuk primer *RBM* : Pre-heat 95° C selama 5 menit, denaturasi 95° C, Annealing 51° C, elongasi 72° C masing-masing selama 45 detik sebanyak 33 siklus dan extention 72° C selama 10 menit

2) Untuk primer *DAZ* : Pre-heat 95° C selama 5 menit, denaturasi 95° C, Annealing 61° C, elongasi 72° C masing-masing selama 45 detik sebanyak 33 siklus dan extention 72° C selama 10 menit

Untuk primer *SRY* : Pre-heat 95° C selama 5 menit, denaturasi 94° C, Annealing 57° C, elongasi 72° C masing-masing selama 1 menit sebanyak 33 siklus dan extention 72° C selama 10 menit

#### 4.6.7. Visualisasi hasil PCR

Hasil PCR divisualisasi melalui elektroforesis dengan 2 % agarose gel dalam elektroforesis *chamber*, staining dengan ethidium bromide dan diamati dengan transiluminator. Oleh karena marker PCR yang digunakan merupakan sequens DNA genom yang spesifik (STS) maka sampel DNA yang mengamplifikasi sesuai ukuran marker STS yang dites menunjukkan bahwa sampel tersebut mengandung sequens DNA yang dimaksud. Sebaliknya apabila tidak mengamplifikasi ukuran marker yang diharapkan setelah tiga kali perlakuan PCR, berarti sampel tersebut mengalami delesi untuk sequens DNA tersebut.

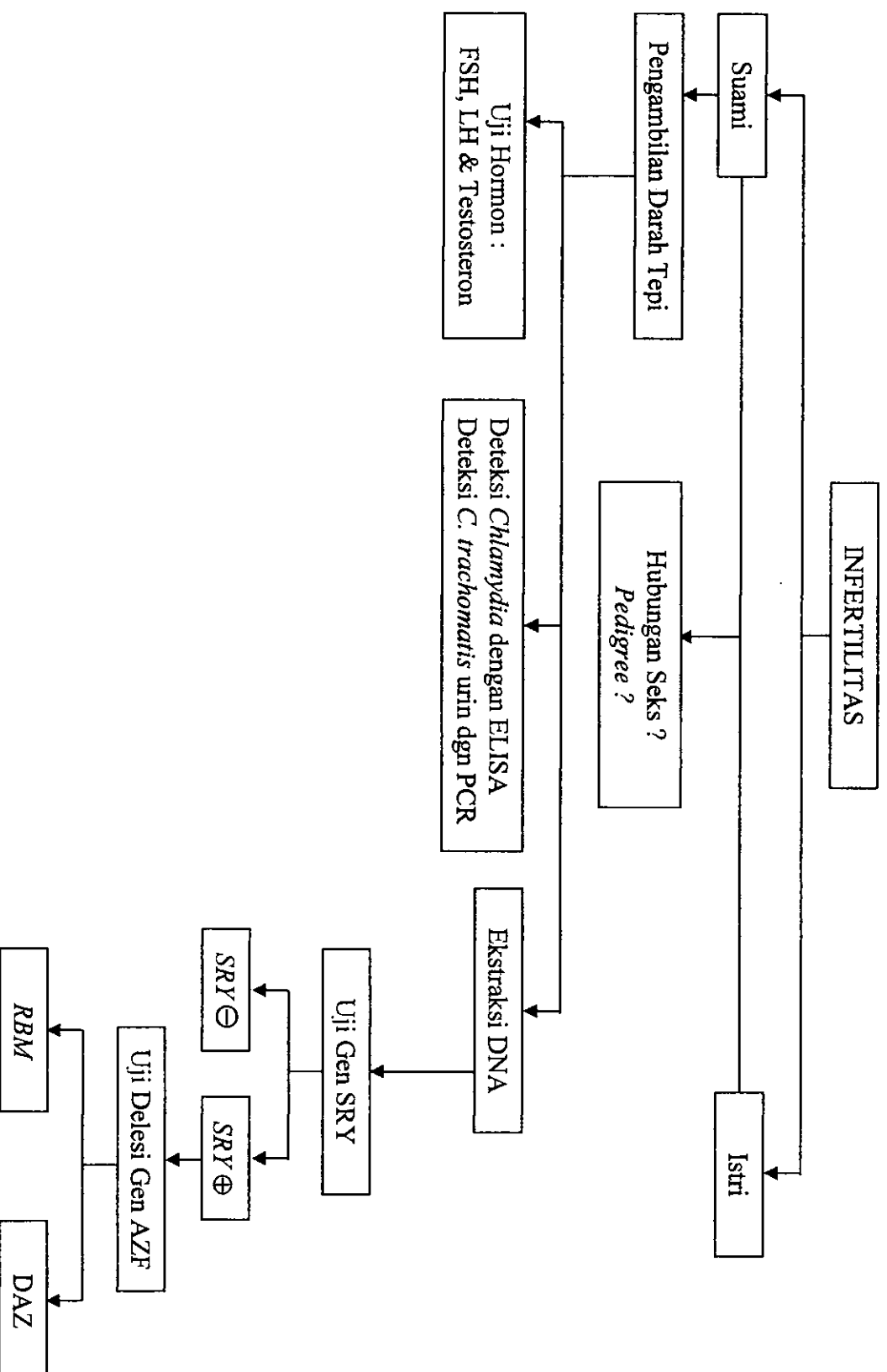
#### 4.6.8. Sequencing hasil PCR

Untuk menentukan urutan nukleotida hasil PCR maka dilakukan *sequencing*. Pertama, hasil PCR dipurifikasi, kemudian dilanjutkan dengan proses *labelling* dengan menggunakan *Big Dye terminator*. Selanjutnya sampel DNA dijalankan dalam mesin *sequencing ABI Prisma 310 Genetic Sequenser*.

#### **4.7. Analisis Data**

Data dianalisis secara deskriptif, hal tersebut karena pada penelitian ini dilakukan secara survey.

## 4.8. Kerangka Kerja Penelitian



Bagan : Kerangka Kerja Penelitian



**BAB 5**  
**ANALISIS HASIL PENELITIAN**

## BAB 5

### ANALISIS HASIL PENELITIAN

#### 5.1. Data Penelitian

##### 5.1.1. Gen *SRY*, *RBM*, dan *DAZ*

Data hasil penelitian identifikasi gen *SRY*, *RBM* dan *DAZ* dari 20 orang pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada Tabel 5.1. Sedangkan data prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ*, ataupun subyek yang mempunyai delesi salah satu atau keduanya yaitu *RBM* atau *DAZ* saja, ataupun delesi *RBM* dan *DAZ*; tersaji pada Tabel 5.2.

Tabel 5.1  
Identifikasi gen *SRY*, *RBM*, dan *DAZ*

No Subyek	<i>SRY</i>	<i>RBM</i>	<i>DAZ</i>
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	-	-	-
5	+	+	-
6	+	+	+
7	+	-	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	-	+
11	+	-	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	+	-	-
15	+	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
18	+	-	-
19	+	-	-
20	+	+	+

Keterangan: + = Tidak Delesi  
- = Delesi  
*SRY* = *Sex determining Region on Y-Chromosome*  
*RBM* = *RNA Binding Motif*  
*DAZ* = *Deleted in Azoospermia*



Tabel 5.2  
 Persentase delesi gen *RBM* dan *DAZ*, delesi *RBM* dan atau *DAZ*

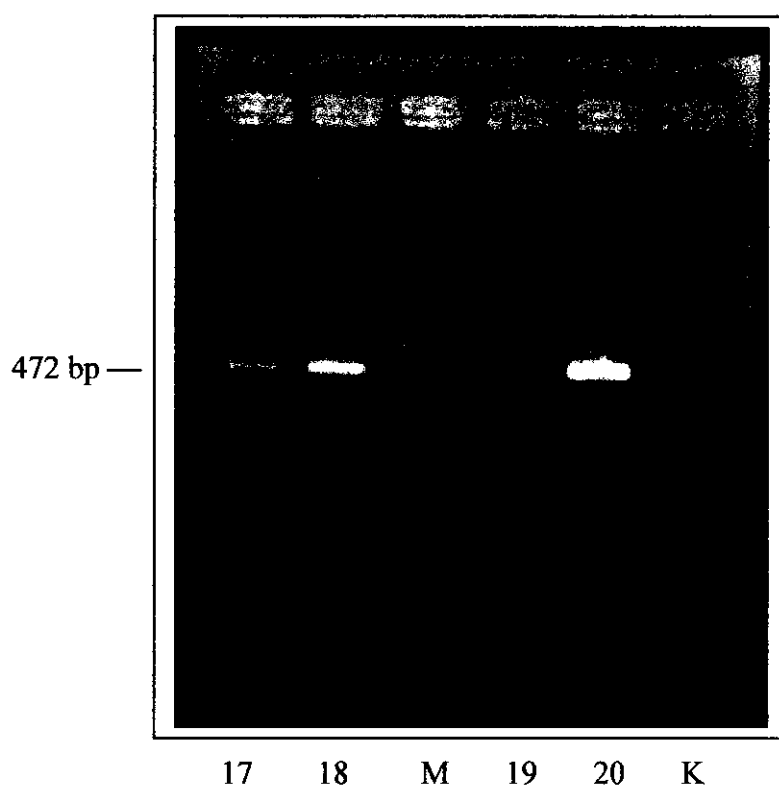
Del <i>RBM</i> + <i>DAZ</i>	Del <i>RBM</i> dan atau <i>DAZ</i>
10	13
(50 %)	(65 %)

**Keterangan:**

Del *RBM* + *DAZ* = Delesi pada *STS-RBM* + *STS-DAZ*

Del *RBM* dan atau *DAZ* = Delesi pada *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*

Hasil *PCR* untuk *STS-SRY* menggunakan *marker 100 bp DNA Ladder* tersaji pada Gambar 5.1., sedangkan hasil *PCR* untuk *STS-RBM* menggunakan *wide range DNA marker* tersaji pada Gambar 5.2; hasil *PCR* untuk *STS-DAZ* menggunakan *wide range DNA marker* tersaji pada Gambar 5.3.



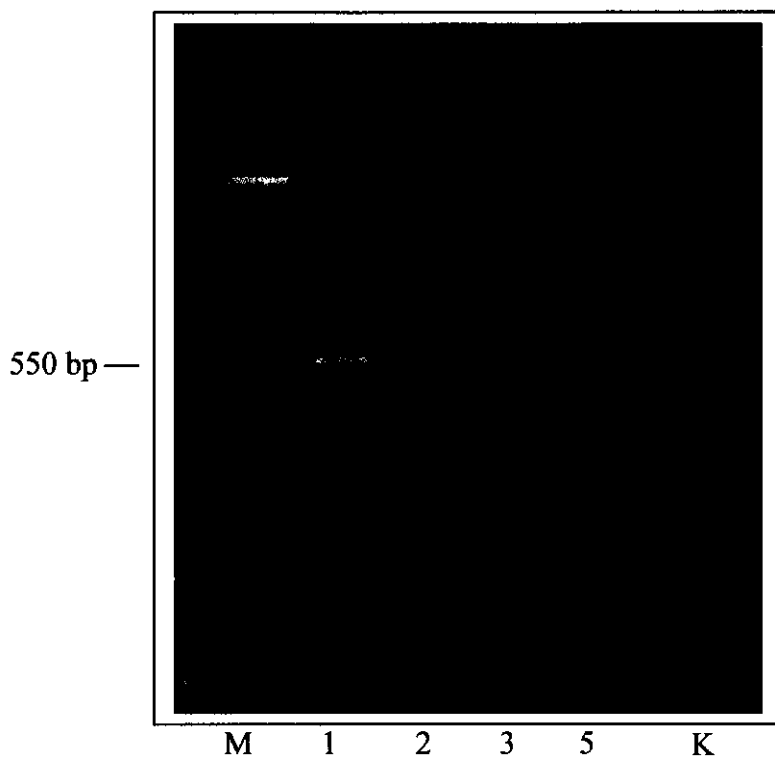
Gambar 5.1  
 Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-SRY*  
 menggunakan *Marker 100 bp DNA Ladder*  
 (Subyek 17, 18, 19, 20)

**Keterangan :**

M = *Standard*

K = *Kontrol Negatif*

17, 18, 19, 20 = *SRY Positif (Sample)*



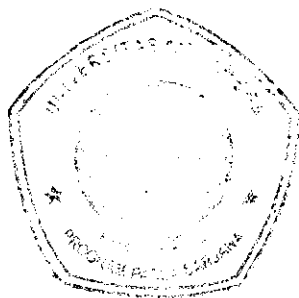
Gambar 5.2  
Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-RBM*  
menggunakan *Wide Range DNA Marker*  
(Subyek 1, 2, 3 dan 5)

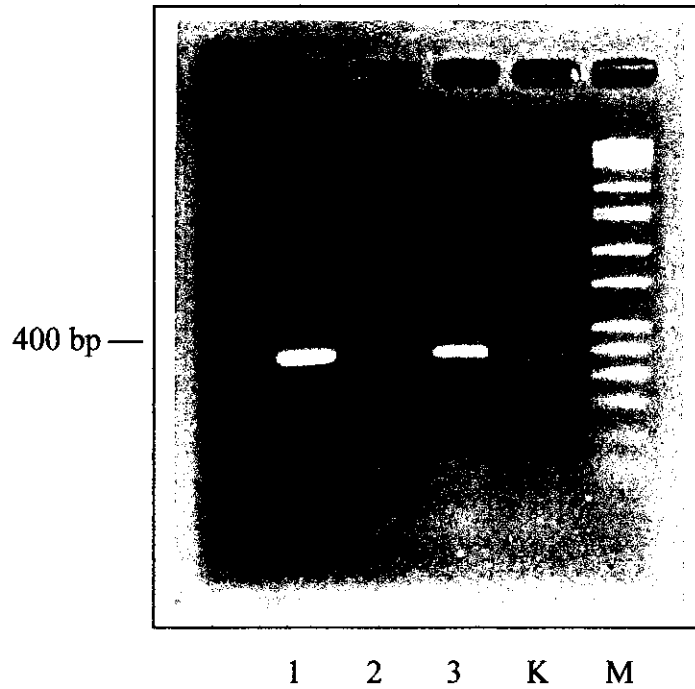
**Keterangan :**

M = Standard

K = Kontrol Negatif

1, 2, 3, 5 = *RBM* Positif (*Sample*)





Gambar 5.3  
Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-DAZ*  
menggunakan *Wide Range DNA Marker*  
(Subyek 1, 2 dan 3)

**Keterangan :**

- M = *Standard*
- K = Kontrol Negatif
- 1, 2, 3 = *DAZ Positif (Sample)*

Analisis sekuen hasil *PCR STS-RBM* dan *STS-DAZ* satu subyek pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada Gambar 5.4. dan Gambar 5.5.

```

15          TTGTAATTCAGATTTTATTTAATAGACCAGATTGTTATTTTAATGA
61  AATTCTAAGGAAAATTGTAAAGGCCATATGCAACATGTTTAAATATTGGAGTATTCTTAA
121 CAGTATAAAGCCTAGGGAATGATATGAAGGTGAGAACTTCAGTTAACGTTAAGAAAATGT
181 GACTGAGCATTACTTTAGAAATTAAGTTTGTTAAGCTGCAAAATACTACTCTTACACTTC
241 TCTTAAATAAAACCTTCTGACTATTAAAGCCTTGATTAATATCCTGTCAACAAAGGCGGA
301 GGAAAGCAGATATTTCCAAATAGTACTTTAACTAATTCATGCTTTAATGATAGCAGTAAA
361 AATGTTTAAATGTAGTCCCACATATTATTTTACCAACCCTGCAGGGACCTCTCATGGTGC
421 ACCACCTGCAGAGGGCCTCGGATGTCTTATGGTGGAAAGCACCTGCCCGCATATAGTAATA
481 CACGAGATAGATATGGCAGAAGTTGG

```

**Gambar 5.4.**  
**Sekuen *STS-RBM* satu subyek pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan**

```

1  CTGCCACCTGTTTTTGTGGTGGAAATGATGCTAGGGTATTGTATTCGTACCTCATTTTT
61  ACCTTAACATACATCATGAACAATGGGATGTGGGCCCTGTTACAACTTAAATTTTTTTTT
121 TGACTTCCTGGAGGTTTAGAATTGCTTTTAGGTTTGACCCATAGGTACTAAAAATATCT
181 TTGACAAAAGGGCTGCTGGTCATTCGGGGATAAATGGGGGAGAAATTTCCACCTCATGGTA
241 GTAAAATGTAGTAAAGTTGAAATTTTTGAATGCTGAATTTTTACTCTGACGTTTCAGTTC
301 TTTCCATAGATGGATGAACTGAGATTGGAAGCTGCTTTGGTAATACCCGGTTCAA

```

**Gambar 5.5.**  
**Sekuen *STS-DAZ* satu subyek pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan**

### 5.1.2. Deteksi *Chlamydia* darah dan *Chlamydia trachomatis* urin

Data hasil uji IgG dan IgM *Chlamydia* darah dengan teknik ELISA terhadap 20 pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan, dan deteksi *Chlamydia trachomatis* pada urin dengan menggunakan teknik PCR; data tersebut tersaji pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3  
Identifikasi Infeksi *Chlamydia* Darah (ELISA) dan  
*Chlamydia trachomatis* Urin (PCR)

No Subyek	Anti <i>Chlamydia</i> IgG (ELISA)	Anti <i>Chlamydia</i> IgM (ELISA)	<i>Chlamydia trachomatis</i> (PCR)
1	Negatif	Negatif	Negatif
2	Negatif	Positif	Negatif
3	Negatif	Negatif	Negatif
4	Negatif	Negatif	Negatif
5	Positif	Negatif	Negatif
6	Negatif	Positif	Negatif
7	Negatif	Negatif	Negatif
8	Negatif	Positif	Negatif
9	Negatif	Negatif	Negatif
10	Positif	Negatif	Negatif
11	Negatif	Negatif	Negatif
12	Negatif	Negatif	Negatif
13	Negatif	Negatif	Negatif
14	Negatif	Negatif	Negatif
15	Negatif	Positif	Negatif
16	Negatif	Positif	Negatif
17	Negatif	Negatif	Negatif
18	Positif	Negatif	Negatif
19	Negatif	Positif	Negatif
20	Negatif	Positif	Negatif

### 5.1.3. Uji hormon FSH, LH dan Testosteron

Data hasil uji hormon FSH, LH dan Testosteron terhadap 20 pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada Tabel 5.4

Tabel 5.4  
 Profil Hormon LH, FSH, dan Testosteron

No Subyek	LH	FSH	Testosteron
1	6.36	15.5	297.4
2	2.85	3.4	537.1
3	4.54	9.14	411.7
4	3.23	5.01	416.2
5	30.4	88.4	118.6
6	5.61	2.37	210.2
7	4.02	5.75	413.9
8	3.83	6.5	469.8
9	7.39	14.5	372.4
10	21	51.1	212.2
11	4.4	4.3	232.3
12	13.8	17	276.5
13	6.79	5.21	424.9
14	4.74	3.96	372.5
15	4.79	16.1	398.9
16	5.46	8.21	298.6
17	6.92	12.2	202.6
18	3.73	1.52	246.3
19	3.32	2.58	488.7
20	6.26	2.14	337.1

**Catatan:**

Nilai Normal LH = 0,8 – 7,6 mIU/ml  
 FSH = 0,7 – 11,1 mIU/ml  
 Testosteron = 280 – 800 ng/dl

#### 5.1.4. Dinamika penduduk

Data kependudukan desa adat Tenganan Pegringsingan sampai akhir Desember 2004 tersaji pada Data 5.1.

Jumlah Penduduk : 309 jiwa (184 Laki-laki dan 125 Wanita)

Data periode 2001 sampai akhir Desember 2004:

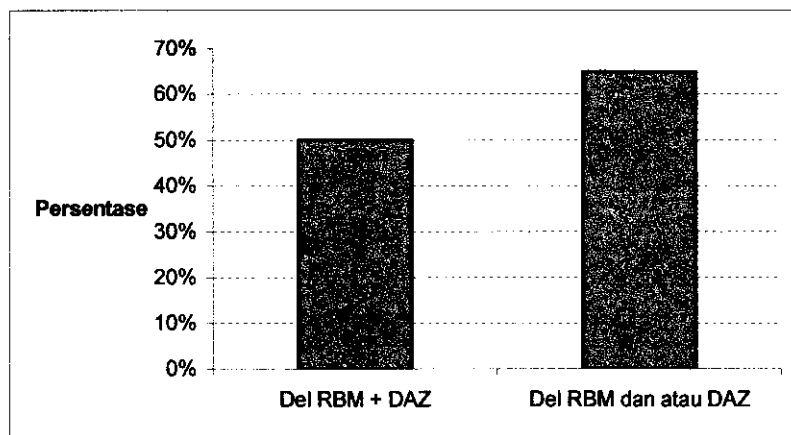
Jumlah kelahiran	: 15 bayi (dari 13 persalinan, 2 kelahiran kembar)
Jumlah kematian	: 11 orang (usia meninggal diatas 60 tahun)
Jumlah Perkawinan	: 16 pasangan (Endogami = 9 dan Eksogami = 7)
Migrasi ke luar desa	: 2 orang

Data 5.1 : Data Kependudukan desa adat Tenganan Pegringsingan

## 5.2. Analisis dan Hasil Penelitian

### 5.2.1. Prevalensi delesi

Subyek dengan delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ* menunjukkan prevalensi yang tinggi yaitu mencapai 50%. Sedangkan subyek dengan delesi *STS-RBM* saja atau delesi *STS-DAZ* saja ataupun delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*, prevalensinya mencapai 65%. (Gambar 5.6)



**Keterangan:**

Del *RBM* + *DAZ* = Delesi pada *STS-RBM* + *STS-DAZ*

Del *RBM* dan atau *DAZ* = Delesi pada *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*

Gambar 5.6

Diagram prevalensi delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*, delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*

**5.2.2. Uji homologi sekuen nukleotida *STS-RBM* salah satu subyek pasangan infertil terhadap sekuen nukleotida *STS-RBM* NCBI (U36218)**

Hasil uji homologi sekuen nukleotida *STS-RBM* satu subyek pria pasangan infertil dari desa adat Tenganan Pegringsingan dengan sekuen nukleotida *RBM* NCBI U36218 (*National Center for Biotechnology Information*) terdapat homologi 84,6%. (Gambar 5.7)

```

[84.6% / 422 bp]      INI/OPT.Score : < 708/ 1266 >

1' TCTTAGAGATSCATTTCAAGATAAGGTAAGGGTCCGGGAIGGATTTGTAAATTATAG
***** **
1" TTGTAAATTACAG

61' AATTGTGTTAATAGACCAGATCGTTATTTAATGAAATTCIAAGGAAAAIACGAGGGA
**** * ***** **
14" AATTTTATTAAATAGACCAGATGTTATTTTAAIGAAAIIKIAAGGAAAATTGTAAAGGC

121' CAAATAAACAATGTCTAAATATTGAGIATTC TAACAGAAGAAAGCATAGGGAA TGATAT
** ** * ***** **
74" CATATGCAAATGTTTAAATAIIGAGTATTC TAACAGTATAAAGCCTAGGGAA TGATAT

181' GAAGGTGAGAACIICAGIICACGTTCAGAAAATGTGACTCAACTTTTACTTTAGAAATTAA
***** **
134" GAAGGTGAGAAITTCAGTTAACGTTAAGAAAATGTGACTGAGCATTACTTTAGAAATTAA

241' AIIIGTTAAGCTTCAGAAATACTTCTCTTACACTTCTTATTAATGGAACTTCTCGATTA
***** **
194" GTTTGTTAAGCTGCAAAAT-ACTACTCTTACACI TCTCTTAAATAAAAECTTCT GACTA

301' TTGCAGGCATAATTAATACTCTGTGACNNNGAC-ANGGNNNGTAGATATTTCCAAATAG
** * * ***** **
252" ITAAAGCCTTGATTAATACTCTGTCAACAAAAGCGGAGGAAAGCAGATATTTCCAAATAG

360' TACTTTAACTTAATCATGCTGTAGTGATACCAAGTAAATGTTIAAATATAGTCCAAACA
***** * ***** **
312" TACTTTAACTAAITCATGCTTAAATGATAGCAGTAAAAATGTTTAAATGTAGTCCCAACA

420' ATTATTTTATCCANATGCATCCTGCAGGGACCTCTCATGGTGCACCATC
***** **
372" ATTATTTTA CCAAA---CCTGCAGGGACCTCTCATGGTGCACCACTGCAAGAGGGC

```

**Keterangan:**

' = U36218 (*RBM* NCBI)

" = *RBM* Tenganan (*Sample*)

Gambar 5.7

Homologi Sekuen Nukleotida satu *sample* *RBM* Tenganan Pegringsingan dengan *RBM* NCBI U3618



### 5.2.3. Uji *Chlamydia* darah dan *Chlamydia trachomatis* urin

Hasil uji IgG dan IgM *Chlamydia* darah 20 subyek pria pasangan infertil dengan menggunakan teknik *ELISA* menunjukkan hasil 15% *Chlamydia* Anti-IgM negatif dan Anti IgG positif (3 diantara 20 subyek), 35% *Chlamydia* Anti-IgM positif dan anti-IgG negatif (7 diantara 20 subyek), sedangkan *Chlamydia* anti-IgM negatif dengan anti-IgG negatif terdapat 50% (10 diantara 20 subyek). Penentuan *Chlamydia trachomatis* pada urin menunjukkan hasil 100% negatif. (Tabel 5.5).

Tabel 5.5  
Identifikasi *Chlamydia* pada darah (ELISA)

<b>Chlamydia</b>	<b>Anti Ig M Positif</b>	<b>Anti IgM Negatif</b>
Anti IgG Positif	0 (0 %)	3 (15 %)
Anti IgG Negatif	7 (35 %)	10 (50 %)

Data deteksi *Chlamydia trachomatis* urin seluruhnya negatif memberi makna bahwa infeksi *Chlamydia trachomatis* pada organ reproduksi tidak terkait dengan kejadian infertilitas pada pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan.

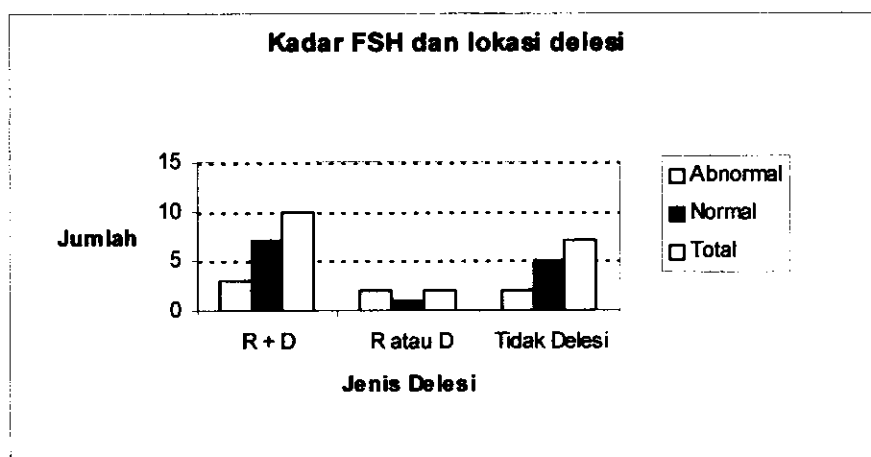
### 5.2.4. Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon FSH, LH dan Testosteron

Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon FSH tersaji pada Tabel 5.6. dan Gambar 5.8.

Tabel 5.6  
Hasil Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon FSH

Kadar FSH	Lokasi delesi		Tidak Delesi	Sub Total
	R + D	R atau D		
Abnormal	3	2	2	7
Normal	7	1	5	13
Total	10	3	7	20

Keterangan : R = delesi *STS-RBM*  
D = delesi *STS-DAZ*



Keterangan: R + D = Delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*  
R atau D = Delesi *STS-RBM* atau *STS-DAZ*

Gambar 5.8  
Diagram Kadar FSH dan lokasi delesi

Diantara 7 subyek yang memiliki kadar *FSH* lebih tinggi dari *range* normal(abnormal), 71% (5 diantara 7 subyek) memiliki delesi gen *RBM* dan atau *DAZ*; sedangkan 29% (2 diantara 7) subyek tanpa delesi *RBM* dan *DAZ*. Pada 13 subyek dengan *FSH* normal, 62% (8 diantara 13) subyek memiliki delesi *RBM* dan atau *DAZ*; 38% (5 diantara 13) subyek tanpa delesi *RBM* dan *DAZ* (Tabel 5.6).

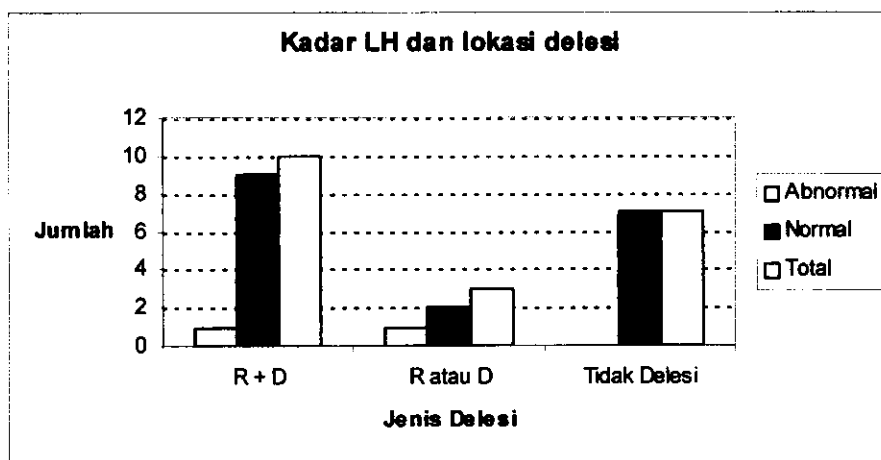
#### Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon *LH*

Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon *LH* tersaji pada Tabel 5.7 dan Gambar 5.9.

Tabel 5.7  
Hasil Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon *LH*

Kadar LH	Lokasi delesi		Tidak Delesi	Sub Total
	R + D	R atau D		
Abnormal	1	1	0	2
Normal	9	2	7	18
Total	10	3	7	20

Keterangan : R = delesi *STS-RBM*  
D = delesi *STS-DAZ*



Keterangan: R + D = Delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*  
R atau D = Delesi *STS-RBM* atau *STS-DAZ*

Gambar 5.9  
Diagram Kadar LH dan lokasi delesi

Evaluasi kadar *LH* terhadap lokasi delesi gen subregion *AZF* (Tabel 5.7), terdapat 10% (2 diantara 20) yang memiliki *LH* tinggi (abnormal) dengan delesi pada *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*. Diantara 18 subyek dengan kadar *LH* normal, 61% (11 diantara 18) terdapat delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*, sedangkan 39% (7 diantara 18) tanpa delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ* (Tabel 5.7)

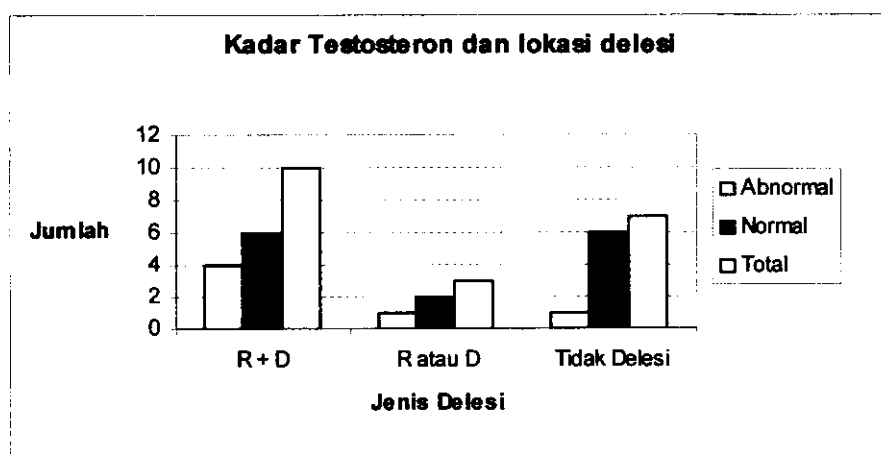
#### Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon Testosteron

Hasil Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon Testosteron tersaji pada Tabel 5.8 dan Gambar 5.10.

Tabel 5.8  
Hasil Analisis delesi subregion *AZF* terhadap kadar hormon Testosteron

Kadar Testosteron	Lokasi delesi		Tidak Delesi	Sub Total
	R + D	R atau D		
Abnormal	4	1	1	6
Normal	6	2	6	14
Total	10	3	7	20

Keterangan : R = delesi *STS-RBM*  
D = delesi *STS-DAZ*



Keterangan: R + D = Delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*  
R atau D = Delesi *STS-RBM* atau *STS-DAZ*  
*STS* = *Sequence-Tagged Sites*

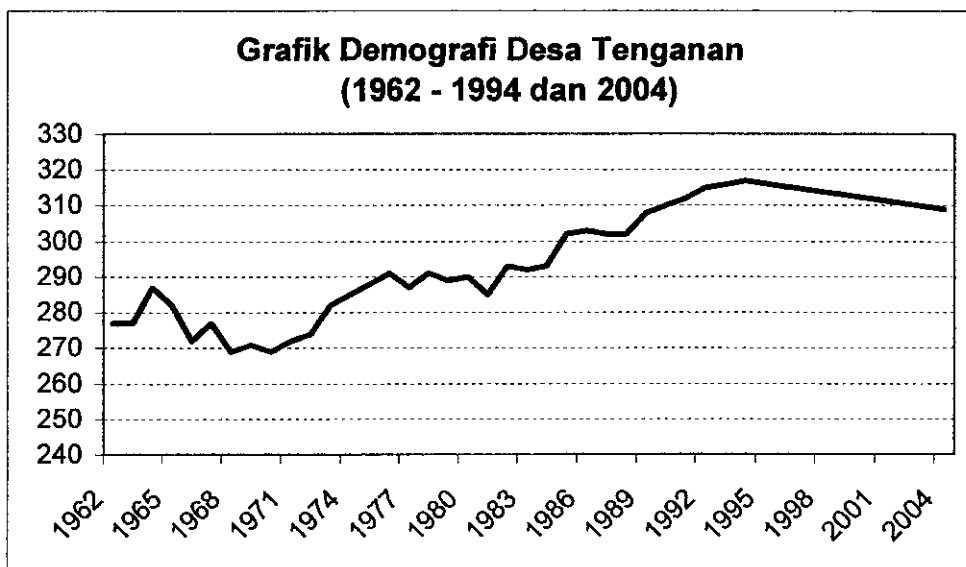
Gambar 5.10  
Diagram Kadar Testosteron dan lokasi delesi

Evaluasi kadar hormon testosteron terhadap lokasi delesi gen subregion *AZF* (Tabel 5.8) terdapat 30% (6 diantara 20) memiliki kadar testosteron dibawah *range* normal dan 70% (14 diantara 20) dengan kadar testosteron dalam batas normal. Dari 6 subyek yang memiliki kadar testosteron subnormal, 83% (5 diantara 6) terdapat delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*; sedangkan 17% (1 diantara 6) tanpa delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*.

Dari 14 subyek dengan testosteron normal, 57% (8 diantara 14) terdapat delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*; sedangkan 43% (6 diantara 14) tanpa ada delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ* (Tabel 5.8 dan Gambar 5.10).

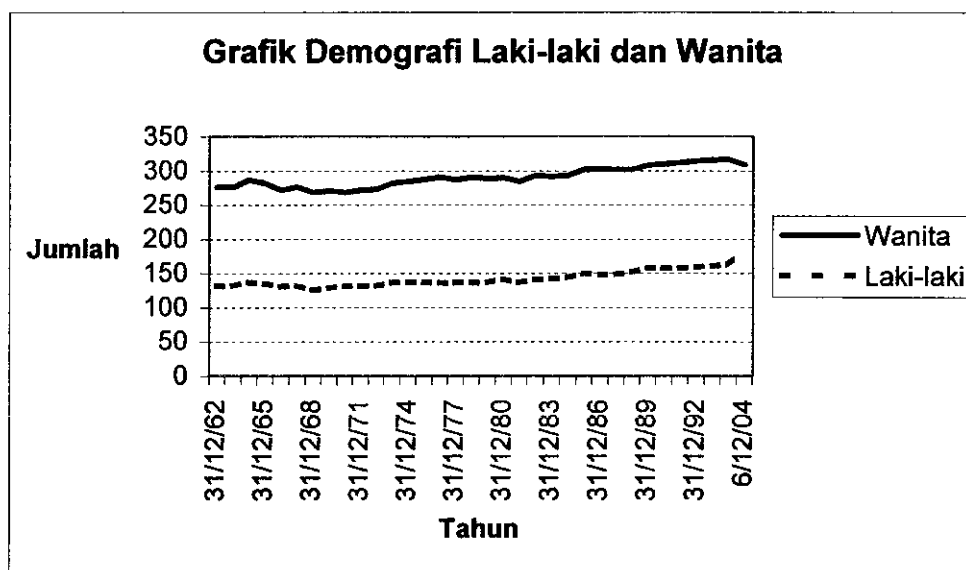
### 5.2.5. Dinamika penduduk desa adat Tenganan Pegringsingan

Grafik demografi penduduk desa adat Tenganan Pegringsingan menunjukkan perkembangan penduduk yang lambat (Gambar 5.11), jumlah wanita lebih banyak dibanding laki-laki (Gambar 5.12), Laju fertilitas semakin rendah (Gambar 5.13), dan Perkawinan kerabat semakin hari semakin berkurang (Gambar 5.14).



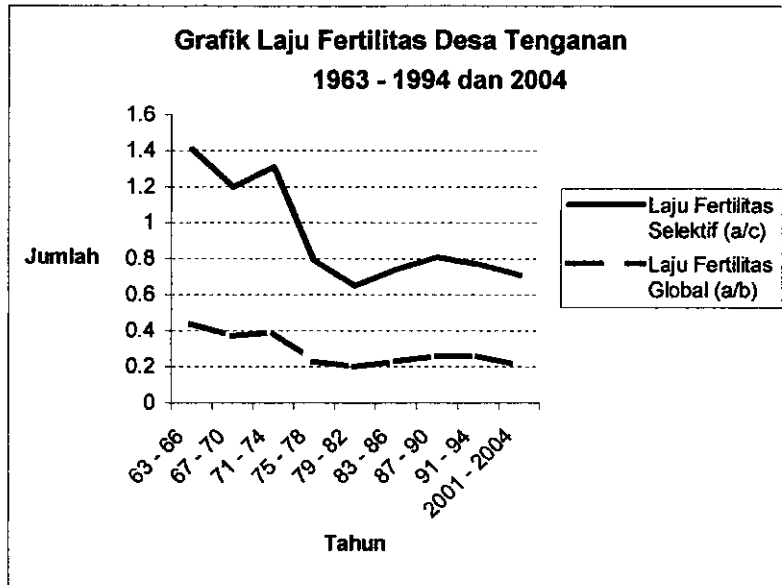
Gambar 5.11

Grafik Demografi Penduduk Desa Tenganan (1962 – 1994 dan 2004)

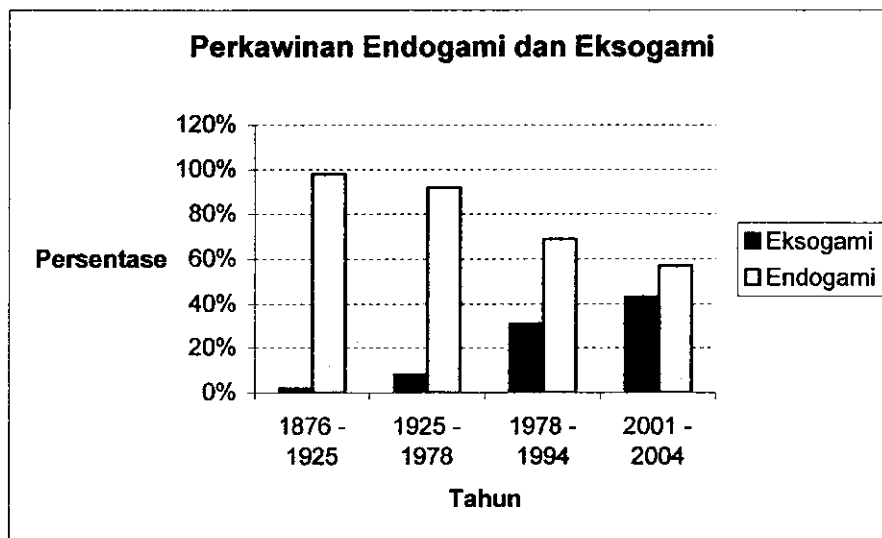


Gambar 5.12

Grafik Demografi Penduduk Laki-laki dan Wanita (1962 – 1994 dan 2004)



Gambar 5.13  
Grafik Laju Fertilitas Desa Tenganan (1963 – 1994 dan 2004)

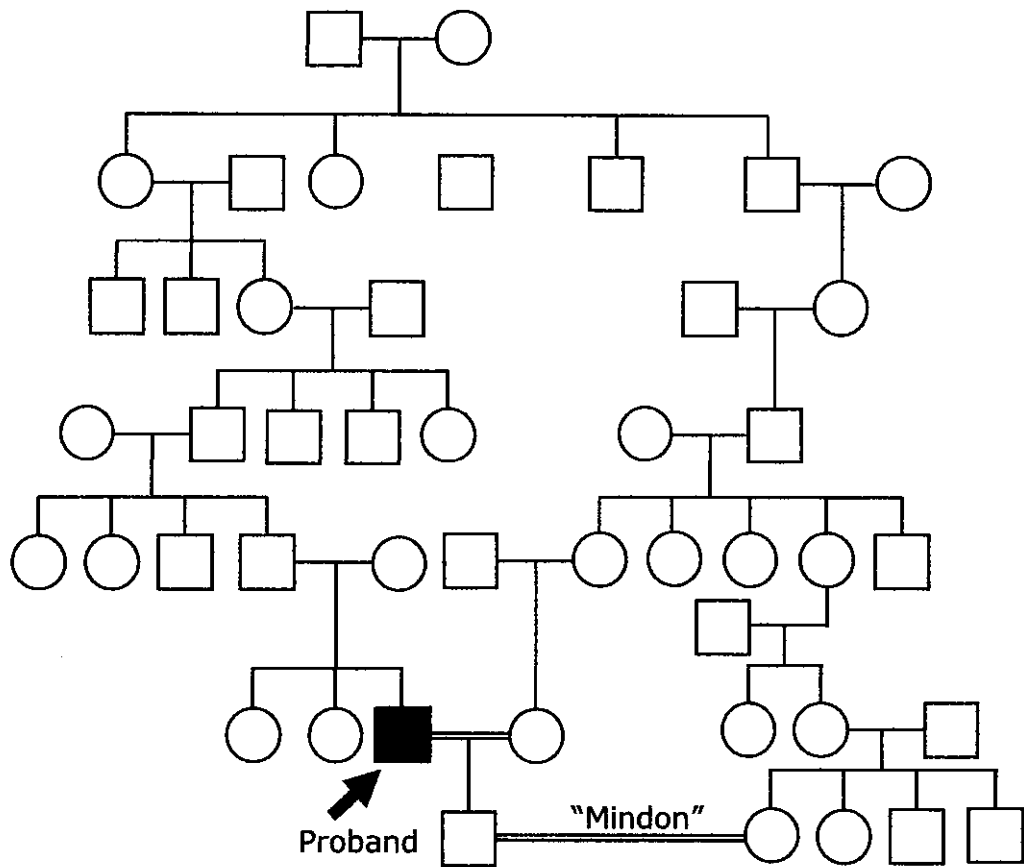


Gambar 5.14  
Diagram Perkawinan Endogami dan Eksogami

### 5.2.6. Analisa Pedigree

*Pedigree* pasangan infertil masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan yang mengalami delesi gen *RBM* dan atau *DAZ* terdapat 2 macam yaitu yang

ayah dari subyek merupakan anak tunggal, dan jenis kedua yang merupakan sebagian besar (80%) ayah subyek memiliki saudara kandung lebih dari satu.

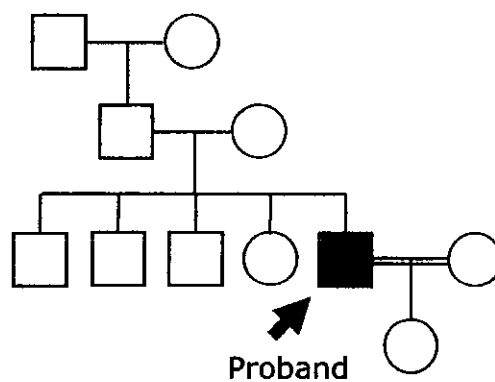


**Keterangan:**

     = Kawin Kerabat

Gambar 5.15

*Pedigree* ayah proband bukan anak tunggal



Gambar 5.16

*Pedigree* ayah proband anak tunggal



**BAB 6**  
**PEMBAHASAN**



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1. Prevalensi delesi gen subregion AZF

Prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ* sebanyak 50% pada pria pasangan infertil pada penelitian ini merupakan angka yang tinggi, bahkan jika penghitungan meliputi satu atau lebih delesi (*RBM* atau *DAZ*, dan atau *RBM* dan *DAZ*) angka prevalensi mencapai 65%. Pada penelitian sejenis yang pernah dilaporkan, pada kelompok subyek ekstrem-oligozoospermia didapat prevalensi 14%, sedangkan jika subyek dengan kualitas sperma yang lebih jelek yaitu azoospermia non obstruktif dengan kategori idiopatik didapatkan prevalensi sebesar 16% (Foresta, 2001); laporan oleh peneliti lain prevalensi delesi tertinggi mencapai 35% (Ferlin, 1999). Hanizar E (2004) mendapatkan prevalensi delesi *RBM* dan atau *DAZ* sebesar 29,7% pada kelompok azoospermia dan 18,7% pada kelompok severe-oligozoospermia. Perbedaan angka prevalensi dari beberapa peneliti tergantung dari selektivitas subyek, semakin selektif yaitu semakin jelek kualitas sperma subyek akan semakin tinggi prevalensi delesi gen *subregion AZF*.

Yang khusus dari penelitian ini adalah populasinya merupakan masyarakat pelaku kawin kerabat yang ketat dan merupakan populasi yang relatif tertutup. Gangguan genetik pada populasi seperti ini, jika ada maka prevalensinya akan tinggi; atau suatu kelainan genetik tidak ditemukan karena nenek moyang tidak memiliki gangguan tersebut.

*STS-RBM* dan *STS-DAZ* merupakan gen terkait dengan spermatogenesis, terletak dalam subregion *AZF* pada kromosom Y. Karena terletak dalam

kromosom Y maka kelainan ini bisa diturunkan kepada anak laki-lakinya dengan manifestasi pada umumnya kualitas sperma yang sub normal (Reijo et al., 1996; Vogt et al., 1996).

Tentang seberapa kuat korelasi antara delesi gen subregion *AZF* terhadap spermatogenesis, masih terdapat variasi dari beberapa peneliti. Elliott (1998) telah membuktikan bahwa protein ekspresi dari *RBM* terdapat dalam spermatogonia tipe A dan B, spermatisit dan spermatid bulat (round spermatid). Fakta menunjukkan bahwa delesi yang sama memberikan tampilan kualitas sperma yang beragam, hal tersebut memberi indikasi bahwa proses spermatogenesis menganut sistim *polygenic* (Layman LC., 2003; Hanizar E., 2004) atau mungkin ada *alel* pada kromosom X yang ikut berperan (Lilford et al, 1994).

#### 6.2. Kasus Subyek Nomor 4: “Pria dengan SRY negatif”

Pria umur 29 tahun, tinggi badan 160 cm, berat badan 75 kg, mengalami infertilitas 6 tahun, hasil analisis sperma didapatkan konsentrasi 2,6 juta per mL. Hubungan suami istri, rata-rata 4 kali sebulan. Hasil pemeriksaan laboratorium didapatkan *SRY* (*sex- determining region on Y chromosom*) negatif, *RBM* (*RNA Binding Motif*) negatif, serta *DAZ* (*Deleted in Azoospermia*) negatif. Hormon *FSH*, *LH* dan Testosteron dalam batas normal (*FSH* = 5,01 mIU/mL; *LH* = 3,23 mIU/mL; dan Testosteron = 416,2 ng/dL), testis posisi normal dalam skrotum dengan volume 14 mL kiri, dan 14 mL kanan; konsistensi agak lunak.

#### Pembahasan

Gen *SRY* terletak pada bagian distal lengan pendek dari kromosom Y, diketahui berperan sebagai *TDF* (*Testis Determining Factor*). Pada kejadian

*balanced translocation*, terjadi translokasi gen tersebut ke kromosom lain (autosom atau seks kromosom), yang sering adalah pada kromosom X . (Domenice S., et al., 2001). Huriez syndrome (Vernole P., et al., 2000) merupakan pria dengan penampilan (fenotip) normal termasuk keberadaan testis dengan genotip 46, XX dengan translokasi. Kasus seperti ini merupakan hal jarang, kejadiannya 1 diantara 20.000 – 25.000 bayi laki-laki (Chapelle DL., 1972).

Terdapat 3 kemungkinan fenotip pria dengan 46,XX yaitu (1) pria dengan genitalia eksterna dan interna normal, (2) pria dengan seks ambigu, yang pada umumnya akan terdeteksi saat bayi karena adanya hipospadia, mikropenis, atau *hyperclitoridy*, atau (3) *true hermaphrodite*, terdapat genitalia eksterna dan interna laki-laki dan perempuan pada individu tersebut (Valetto A. et al., 2005).

Hasil pemeriksaan tidak dapat diidentifikasi gen *SRY*, hal tersebut dapat terjadi karena enzim *endonuklease* yang digunakan dirancang untuk memotong pada segmen tertentu di kromosom Y; jika kejadian translokasi terjadi penempelan ke kromosom lain (autosom atau kromosom seks) dengan perlekatan yang tidak lazim maka pemeriksaan laboratorium yang dilakukan akan memungkinkan tidak dapat mendeteksi gen *SRY* yang mengalami translokasi.

Kemungkinan lain, adanya *mosaicism* yaitu adanya keadaan campuran, sebagian limfosit mengandung kromosom 46,XX tetapi limfosit yang lain 46,XY.

Untuk konfirmasi hal tersebut di atas, pemeriksaan kromosom dapat menjawab. Pada penghitungan kromosom dari 100 limfosit, akan diketahui ada tidaknya *mosaicism*. Teknik *banding* (*G-banding* ataupun *Q-banding*) akan dapat menentukan ada tidaknya translokasi.

### 6.3. Prevalensi delesi gen subregion *AZF* dan Dinamika populasi

Prevalensi delesi gen subregion *AZF* pada pria pasangan infertil mencapai 65% pada masyarakat tertutup yang melakukan kawin kerabat secara ketat, pada masa mendatang akan berpengaruh terhadap dinamika populasi. Pria dengan kualitas sperma kurang bagus karena faktor delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*, prevalensinya akan semakin meningkat; apalagi jika lebih banyak anak laki-laki dilahirkan maka kemungkinan gen delesi diteruskan ke generasi berikutnya menjadi dimungkinkan (Vogt et al., 1996; Pryor et al., 1997).

Delesi gen subregion *AZF* yang terjadi secara *denovo* (Reijo et al., 1996) maksudnya terjadi pada suatu kehidupan individu tanpa ayahnya mengalami delesi, dan dapat diwariskan kepada anak laki-laki. Pada populasi tertutup dengan tradisi kawin kerabat yang ketat, kondisi tersebut bisa menjadi faktor yang tidak menguntungkan. Prevalensi delesi dari waktu ke waktu akan semakin meningkat karena masyarakat relatif tertutup, hal tersebut berarti populasi tidak berkembang atau semakin berkurang. Populasi tidak berkembang jika tidak ada kompensasi dari pasangan yang *fit* untuk mempunyai anak lebih banyak, populasi berkurang atau angka fertilitas semakin rendah; terjadi fenomena *inbreeding depression*.

Kejadian infertilitas pria karena delesi gen subregion *AZF*, dalam tinjauan genetik tidak selalu berarti kerugian. Proses ini terjadi merupakan bagian dari mekanisme homeostasis, individu yang memiliki delesi gen dan mewariskan pada anak laki-lakinya maka anak laki-lakinya memiliki kualitas sperma yang semakin jelek, kemudian dapat mengalami infertilitas; yang hal ini berarti transfer gen bermasalah menjadi terhenti.

Jika individu yang *fit* mau mempunyai anak yang banyak maka pengurangan jumlah populasi berubah arah, jumlah individu dalam populasi akan meningkat kembali dengan kualitas 'sehat' secara genetik.

Data kependudukan desa Tenganan Pegringsingan sampai akhir desember 2004 menunjukkan populasi tidak berkembang (Gambar 5.11), jumlah wanita lebih banyak dibanding laki-laki (Gambar 5.12), laju fertilitas semakin berkurang (laju fertilitas global = 0,20 dan laju fertilitas selektif = 0,47) (Gambar 5.13) dan endogami yang semuanya kawin kerabat mencapai 57% (Gambar 5.14). Dari 15 anak yang dilahirkan dalam 3 tahun terakhir, 9 anak adalah laki-laki dan 6 wanita; lebih banyaknya anak laki yang dilahirkan, akan menjadi hal yang tidak menguntungkan dari tinjauan kemungkinan transfer gen delesi.

Pada penelitian ini terlihat masalah bahwa infertilitas yang terjadi kemungkinan karena faktor genetik yaitu gangguan gen penyandi spermatogenesis (delesi gen *RBM* dan *DAZ*), maka langkah penggunaan teknik bantu reproduksi (*Assisted Reproductive Techniques – ART*) perlu difikirkan dan diadviskan pada penderita yang mengalami infertilitas selagi jumlah spermatozoa belum semakin jelek. Pada individu dengan delesi gen subregion *AZF*, lazimnya dengan berlangsungnya waktu akan terjadi penurunan kualitas sperma dan gangguan seperti ini tidak akan dapat diperbaiki dengan pengobatan medikamentosa. Memilih langkah pengobatan yang tepat akan merupakan bantuan untuk efisiensi dan efektivitas dalam pencapaian tujuan mengatasi masalah infertilitas.

#### 6.4. Infertilitas dan *Chlamydia trachomatis*

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi *Chlamydia* darah dengan uji *ELISA*, dan *Chlamydia trachomatis* pada urin dengan menggunakan metoda *PCR*.

Hasil pemeriksaan *Chlamydia* darah dengan teknik *ELISA* didapatkan 50% (10 diantara 20 subyek) anti-IgG *Chlamydia* negatif dan anti-IgM *Chlamydia* negatif, 35% (7 diantara 20 subyek) anti-IgG *Chlamydia* negatif dan anti-IgM *Chlamydia* positif, 15% (3 diantara 20 subyek) anti-IgG *Chlamydia* positif dan anti-IgM *Chlamydia* negatif; sedangkan deteksi *Chlamydia trachomatis* urin dengan *PCR* menunjukkan hasil 100% negatif (Tabel 5.3).

Pada penentuan anti-IgG *Chlamydia* darah dengan metoda *ELISA*, digunakan kit “wampole laboratories *chlamydia IgG ELISA*” yang dapat menentukan anti-IgG *Chlamydia* secara kualitatif.

*Chlamydia* merupakan mikroorganisme yang bersifat parasit obligat intra-seluler. Terdapat 3 spesies *Chlamydia* yaitu *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* dan *Chlamydia psittaci*.

*Chlamydia trachomatis* berhubungan dengan kejadian infeksi traktus urogenital, trachoma, pneumoni pada bayi dan lymphogranuloma venerum sedangkan *Chlamydia pneumoniae* dan *Chlamydia psittaci* terkait dengan pneumonia dan infeksi saluran napas. (Schachter J., 1980; Campbell LA., et al., 1990).

Pada penentuan anti-IgM *Chlamydia* darah dengan metoda *ELISA*, digunakan kit “SeroELISA *Chlamydia true IgM*” Catalog no. 112-01; kit ini mampu mendeteksi antibodi *C. trachomatis* serovarian L-2, *C. psittaci* dan *C. pneumoniae*.

Analisis hasil penentuan anti-IgG *Chlamydia* dan anti-IgM *Chlamydia* memberi makna bahwa 15% subyek pernah terinfeksi *Chlamydia* dan sudah mempunyai kekebalan (IgG positif dan IgM negatif), 35% subyek terinfeksi *Chlamydia* fase akut (IgG negatif dan IgM positif), sedangkan 50% subyek belum pernah terinfeksi *Chlamydia* dan dapat diartikan beresiko karena belum memiliki kekebalan (IgG negatif dan IgM negatif), atau kondisi pernah terinfeksi di masa lalu yang sudah lama dapat juga memberikan gambaran IgG negatif – IgM negatif.

*Chlamydia trachomatis* memiliki 15 serovarian. Serovarian A, B, Ba dan C terkait dengan penyakit trachoma, serovarian L1 – L3 menyebabkan lymphogranuloma venerum; serovarian D-K merupakan penyebab penyakit menular seksual yaitu cervicitis, endometritis, salpingitis dan uretritis. Endometritis dan salpingitis dapat menyebabkan pembuntuan tuba falopii yang tentunya akan dapat menyebabkan terjadinya infertilitas.

Pada pemeriksaan *Chlamydia trachomatis* urin dengan PCR, didapatkan 100% hasilnya negatif. Data tersebut memberi 2 makna, pertama bahwa antibodi yang terdeteksi pada darah adalah bukan antibodi *Chlamydia trachomatis*; kedua bahwa dengan tidak adanya *Chlamydia trachomatis* dari urin dapat ditarik pengertian lebih jauh bahwa faktor infeksi *C. trachomatis* tidak ikut berpengaruh dalam munculnya kejadian infertilitas.

Tahapan memeriksa *Chlamydia* darah dengan teknik *ELISA* melanjutkan dengan deteksi *Chlamydia trachomatis* urin, tidak perlu dilakukan. Untuk tujuan deteksi *Chlamydia trachomatis* sebaiknya dilakukan langsung memeriksa urin dengan teknik *PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Beberapa pertimbangan karena

adanya infeksi *Chlamydia trachomatis* urin tidak selalu terdeteksi dengan uji imunoglobulin darah, karena di darah kadarnya relatif rendah dan lokasi infeksi di di dalam endotel uretra.

#### **6.5. Hormon FSH, LH, Testosteron dan delesi gen subregion AZF**

Pada FSH abnormal didapatkan prevalensi delesi RBM dan DAZ pada subyek dengan FSH abnormal sebanyak 71% (5 diantara 7), sedangkan yang tanpa delesi RBM dan DAZ sebanyak 29% (2 diantara 7) (Tabel 5.6).

FSH yang abnormal, lebih tinggi dari *range* normal memberi arti laboratoris adanya kegagalan fungsi testis primer yaitu gangguan spermatogenesis. Target sel dari FSH adalah sel sertoli yang terdapat didalam tubulus seminiferus testis.

Sel sertoli membentuk protein khusus yaitu *ABP (Androgen Binding Protein)* yang berfungsi mengangkut testosteron untuk proses spermatogenesis serta pematangan spermatozoa (Wilson et al., 1998). Selain membentuk ABP, sel sertoli juga menghasilkan inhibin yang berfungsi pada mekanisme umpan balik untuk menghambat produksi FSH, sehingga kadar FSH terkontrol. Sindroma sel sertoli (*SCOS = Sertoli Cell Only Syndrome*) merupakan kondisi yang sering terjadi sebagai akibat dari delesi pada subregion AZFc, yang merupakan lokasi STS-DAZ.

Dalam penelitian ini tak terdapat pola yang konsisten antara kadar FSH yang tinggi dengan delesi STS-DAZ (Lampiran 1). Bahwa FSH yang tinggi dapat juga terjadi karena proses menua (*aging process*).

Hormon LH dan testosteron terhadap pola delesi gen subregion AZF menunjukkan tidak terdapat pola yang konsisten.



#### **6.6. Analisis homologi sekuen nukleotida STS-RBM terhadap sekuen nukleotida RBM NCBI U36218 (*National Center for Biotechnology Information*)**

Analisis homologi sekuen nukleotida gen *RBM* Tenganan Pegringsingan dalam penelitian ini terhadap sekuen gen *RBM* dari *NCBI U36218 (National Center of Biotechnology Information)* terdapat homologi 84,6%. Hal ini menunjukkan bahwa *band* yang didapat sudah benar karena terdapat kesamaan relatif banyak dengan sekuen NCBI.

#### **6.7. Analisis *Pedigree* pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan**

*Pedigree* didapat sampai 6 generasi, merupakan fakta yang khusus. Hal tersebut karena *Pedigree* (silsilah) menjadi salah satu sarana dalam desa adat yang dapat membantu pada saat suami-istri ada masalah yang sampai terkait hak waris. Tanah dan rumah tinggal merupakan milik desa adat, anak paling bungsu akan menjadi pewaris, karena anak yang sudah menikah lebih dulu harus pindah dari rumah orang tuanya. Rumah tinggal sudah disediakan oleh desa adat. Anak wanita yang kawin dengan pria luar desa adat, tidak akan mendapat hak waris; sedangkan pria yang kawin dengan orang luar, masih boleh tinggal di desa adat, bisa mendapat waris tetapi tidak boleh menjadi pengurus desa adat.

Dari beberapa *Pedigree* generasi awal, tampak lebih banyak kejadian infertilitas primer. Hal tersebut jika dikaitkan dengan data penurunan fertilitas antar waktu, serta adanya sarana kontrasepsi pada beberapa tahun belakangan ini; menunjukkan bahwa pada belakangan ini kontrasepsi memberi peran yang berarti dalam mengatur kehamilan. Tinjauan data tersebut menunjukkan bahwa saat ini,

jika tanpa intervensi kontrasepsi, kemungkinan jumlah penduduk berada pada *trend* yang naik. Faktor ekonomi, biaya menyekolahkan anak yang tidak murah menjadikan salah satu faktor masyarakat membatasi jumlah anak.

Banyaknya subyek (delesi dan infertil) dengan ayah bukan merupakan anak tunggal, memberikan dugaan bahwa delesinya terjadi secara deNOVO (80%). Sebagian kasus (20%) ayah dari subyek merupakan anak tunggal, sehingga dapat diduga bahwa gangguan yang ada kemungkinan sudah terjadi pada ayahnya.

#### **6.8. Saran dan Tindakan praktis**

Setelah diketahui terdapat faktor genetik yang dominan (khususnya subyek nomer 4: *SRY* negatif, *RBM* negatif dan *DAZ* negatif), dengan analisis sperma yang hasilnya kurang baik, ekstrem-oligozoospermia (2,6 juta spermatozoa per mL); saran secara khusus telah diberikan kepada penderita untuk lebih mengarahkan langkah penanganan infertilitasnya pada teknik bantu reproduksi.

Terhadap subyek yang pada pemeriksaan menunjukkan IgM *Chlamydia* positif telah diberikan obat anti *Chlamydia*.

Terhadap masyarakat, melalui tokoh-tokoh desa adat, telah didiskusikan cara untuk melestarikan populasi masyarakat.



**BAB 7**  
**PENUTUP**

## BAB 7

### PENUTUP

#### 7.1. Kesimpulan

Dari hasil kajian tentang delesi subregion AZF dalam kromosom Y pada pria pasangan infertil pada masyarakat yang melakukan kawin kerabat, diperoleh kesimpulan sebagai berikut :

- 7.1.1. Terdapat prevalensi yang tinggi delesi gen *RBM* dan *DAZ* (50% delesi *RBM* dan *DAZ*, 65% Delesi salah satu atau keduanya *RBM* dan *DAZ*) pada pria pasangan infertil yang melakukan kawin kerabat.
- 7.1.2. Delesi gen *RBM* dan *DAZ* diduga terkait dengan kejadian infertilitas pada pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan. Faktor *Chlamydia trachomatis* urin tidak terbukti, faktor hormonal (FSH, LH dan Testosteron) menunjukkan pola yang tidak konsisten.
- 7.1.3. Dari analisis pedigri menunjukkan kecenderungan terjadi delesi secara deNOVO, hal tersebut disimpulkan dari kebanyakan subyek yang mengalami delesi *RBM* dan atau *DAZ*, ayahnya bukan anak tunggal (18%) dan bahkan sebagian besar memiliki saudara kandung yang banyak.
- 7.1.4. Perkawinan endogami di desa adat Tenganan Pegringsingan jumlahnya semakin menurun, sedangkan perkawinan eksogami semakin meningkat.

## 7.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang :

- 7.2.1. Analisis penyebab delesi gen *RBM* dan *DAZ* dalam masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan.
- 7.2.2. Analisis kromosom dengan teknik *banding* pada kasus pria dengan *SRY* (*sex determining region on y-chromosome*) negatif.
- 7.2.3. Analisis faktor penyebab penurunan angka kesuburan dalam masyarakat pelaku kawin kerabat di desa adat Tenganan Pegringsingan.
- 7.2.4. Analisis pola *inbreeding depression* kawin kerabat dalam masyarakat desa adat Tenganan Pegringsingan .



# DAFTAR PUSTAKA

## DAFTAR PUSTAKA

- Agulnik, A. Zharkikh, A. Boettger-Tong, H. Bourgeron, T. McElreavey, K. Bishop C, 1998. Evolution of *DAZ* Gene Family Suggests that Ylinked *DAZ* Plays Little, or Role in Spermatogenesis but Underlines A Recent African Origin for Human Population. *Human Molecular Genetics* 7: 1371-1377.
- Baker HW, 1994. Clinical male infertility. II. Critical evaluation of the prospects for therapy. *Reprod. Fertil. Dev.* 6: 9 – 12.
- Bhasin S., de Kretser DM., & Baker HWG, 1994. Pathophysiology and natural history of male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 79: 1525 – 1529.
- Breguet G, 1985. Tenganan Project. University of Geneva, Switzerland, pp: 14.
- Breguet G, 1995. From Isolation to Modernity: Demographic Transition and Public Health Changes in Tenganan Pegringsingan (Bali) Over Two Decades: 1976 – 1995, pp: 1 – 19.
- Chai NN, Zhou H, Hernandez J, Najmabadi H, Bhasin S, Yen PH, 1998. Structure and organization of the *RBMY* genes on the human Y chromosome : transposition and amplification of the ancestral autosomal hnRNPG gene. *Genomics* 49 : 283 – 289.
- Chapelle ADL, 1972. Nature and origin of males with XX sex chromosomes. *Am J Hum Genet* 24: 71 – 105.
- Chiang, Han-sun. Hsiao-Jui Wei & Yu-Tzu Chen, 2000. Genetic Screening for Patients with Azoospermia and Severe Oligoasthenospermia. *International Journal of Andrology*, 23: 20-25.
- Cram, David S. Ma, K. Bhasin, S. Arias, J. Panjaitan, M. Chu, B. Audrins, P. Saunders, D. Quinn, F. de Kretser, D. McLachlan R, 2000. Y Chromosome Analysis of Infertile Men and Their Son Conceived through Intracytoplasmic Sperm Injection : Vertical Transmission of Deletion and Rarity of The novo Deletion. *Fertility and Sterility* . Nov. 74 (5): 909-915.
- Christensen K, 2002. Relation and Inbreeding. In: *Population Genetics*, pp: 26 – 27.

- Crotchfelt KA., Welsh LE., Debonville D., Rosenstraus M., Quinn TC, 1997. Detection of *N. gonorrhoe* and *Chlamydia trachomatis* in Genitourinary Specimens from Men and Women by Coamplification PCR Assay. *J. of Clinical Microbiology*. June, pp: 1536 – 1540.
- Domenice S., Nishi MY., Billerbeck AEC., Carvalho FM., Frade EMC., Latronico AC., Arnhold IJP, 2001. Molecular analysis of SRY in Brazilian 46,XX sex reversed patients: absence of SRY sequence in gonadal tissue. *Med Sci Monit*. 7(2): 238 – 241.
- Eberhart CG, Maines JZ, Wasserman SA, 1996. Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human deleted in azoospermia. *Nature* 381 : 783 – 785.
- Edward, R.G. & Bishop, C.E, 1997. On The Origin and Frequency of Y Chromosome Deletions Responsible for Severe Male Infertility. *Molecular Human Reproduction*, 3: 549-554.
- Elliot D.J, Oghene K, Makarov G, Makarova O, Hargreave T.B, Chandley A.C, Eperon LC & Cooke H, 1998. Dynamic Changes in The Subnuclear Organisation of Pre-mRNA Splicing Proteins and *RBM* during Human Germ Cell Development. *Journal of Cell Sciences*, 111:1255-1265.
- El-Najjar, 1996. Consanguinity in Kuwait. *Coll. Antropol.* 20: 2; 275 – 282.
- Ferlin A, Moro E, Garolla A and Foresta C, 1999. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes *DAZ*, *RBM* and *DFFRY*. *Human Reproduction*, 14 (7) : 1710 – 1716.
- Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B. and Foresta C, 2003. The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region : sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *Journal of Medical Genetics*, 40 : 18 – 24.
- Foresta C, Moro E, Ferlin A, 2001. Y Chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 22: 226 – 239.
- Friel, A. J.A. Houghton, M. Mahrer. T. Smith. S. Noel. A. Nolan. D. Egan & M. Glennon, 2001. Molecular Deletion of Y Chromosome Microdeletions : An Irish Study. *International Journal of Andrology*, 24 (1): 31-36.
- Galle PC, 1988. Polycystic ovarian disease. In: *Current therapy of infertility-3*. Garcia CR et al., Philadelphia, pp: 112 – 116.
- Gelehrter TD., Collins FS, 1990. Mendelian Inheritance. In: *Principle of Medical Genetics*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, pp: 27 – 45.



- Girardi, S.K. Mielnik, A. Schelgel, P.N, 1997. Submicroscopic Deletion in The Y Chromosome of Infertile Men. *Human Reproduction*. 12: 1635-1641.
- Glaser B, Yen PH, Schempp W, 1998. Fibre-fluorescence in situ hybridization unravels apparently seven *DAZ* genes or pseudogenes clustered within a Y-chromosome region frequently deleted in azoospermic males. *Chromosome Res.* 6: 481 – 486.
- Glinka J., Antaria MD., Kusbardiyanti T, 1996. On the relationship between cleft and cleft palate and consanguinity. *Homo vol.*, 36: 21 – 39.
- Glinka J, 2005. Model perkawinan dan dampak biologisnya dalam populasi. PS Antropologi FISIP & Laboratorium Antropologi Ragawi FK, Universitas Airlangga. Belum dipublikasi.
- Goessens WHF., Mouton JW., Meijden WI., Deelen S., Rijsoort-Vos TH., Toom NL., Verbrugh HA., Verkooyen RP, 1997. Comparison of Three Commercially Available Amplification Assays, AMP CT, LCx, and COBAS AMPLICOR, for Detection of *Chlamydia trachomatis* in First-Void Urine. *J. of Clin. Microbiology*, Oct.: 2628 – 2633.
- Hanizar E, 2004. Delesi region AZF (Azoospermic Factor) dalam kromosom Y Pria pasangan infertil berdasarkan etnis di Indonesia. Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Hargreave, T.B, 1999. Understanding The Y Chromosome. *Lancet*. Nov.20.
- Hoffer, M.J.V. de Vries, J.W.A. Redeker, B. Repping, S. Brown, L.G.-Page, D.C. Hoovers, J.M.N van der Veen, F. Leschot, N.J, 1999. Microdeletions in The Y Chromosome in Idiopathic Infertile Men. [http://www.faseb.org/genetiks/ashg99/fl\\_254.htm](http://www.faseb.org/genetiks/ashg99/fl_254.htm)
- Hull MGR, Glazener CM, Kelly NJ, et al. 1985. Population study of causes, treatment and outcome of infertility. *Br Med J.* 291 : 1693 – 1697
- Kent-First, M, Muallem. A, Shultz J, Pryor J, Robert K, Noten W, et al., 1999. Defining Regions of The Y-chromosome Responsible for Male Infertility and Identification of A fourth AZF Region (AZFd) by Y-chromosome Microdeletion Detection. *Molecular Reproduction Deviation*, 53: 27-41.
- Kent-First, M.G. S. Kol. Muallem, A. Ofir, R. Manor, D. Blaser, S. First, N. Itskovitz-Eldor, J, 1996. The Incidence and Possible Relevance of Y-linked Microdeletions in Babies Born after Intracytoplasmic Sperm Injection and Their Infertile Fathers. *Molecular Human Reproduction* 2: 943-950.
- Kirsch S, Keil R, Edelmann A, et al., 1996. Molecular Analysis of The Genomic Structure of The Human Y Chromosome in The Euchromatic Part of Its Long Arm (Yq11). *Cytogenetic Cell Genetics*, 75: 197-206.

- Korn VE, 1933. Bali, Studies in Life, Thought, and Ritual, pp: 304 – 342.
- Krausz, C and Ken McElreavey, 1999. Y Chromosome and Male Infertility. *Frontiers in Bioscience* 4, January 15.
- Lahn, B.T and Page D, 1998. Functional Coherence of The Human Y Chromosome. *Science*, 278 : 675-680.
- Layman LC, 2003. Genes Causing Male Infertility in Humans. *MAI* (7) : 202 – 215.
- Lee JH, Lee DR, Yoon SJ, Chai YG, Roh SI, Yoon HS, 1998. Expression of *DAZ* (deleted in azoospermia), *DAZL1* (*DAZ*-like) and protamine-2 in testis and its application for diagnosis of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Mol Hum Reprod*, 4 : 827 – 834.
- Mahadevaiah SK, Odorisio T, Elliot DJ, Rattigan A, Szot M, Laval SH, Washburn LL, McCarrey JR, Cattanach BM, Lovell-badge R, Burgoyne PS, 1998. Mouse homologues of the human AZF candidate gene *RBM* are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet*, 7 : 715 – 727.
- Maurer, B.J. Gromoll. M. Simoni & E. Nieschlag, 2001. Prevalency of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men Who Consulted A Tertiary Care Medical Centre The Munster Experience. *Andrologia*,33 (1) : 27-33.
- Moro E. et al., 2000. Male Infertility caused by a de Novo Partial Deletion of the *DAZ* Cluster on the Y Chromosome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85 (11) : 4069 – 4073.
- Naysmith, Tracy. Wendy Smale, Cynthia van Ee, Guy Gudex, 2000. Identification of Y-chromosome Deletions in Men with Subfertility. Departemen of Obstetrics and Gynaecology - Auckland University.
- Nicholas FW, 1987. Relationship and inbreeding. In: *Veterinary Genetics*. Clarendon press Oxford, pp: 365 – 377.
- Osterlund, Christina. Eva Segersteen. Steven Arver & Ake Pousette, 2000. Low Number of Y-Chromosome Deletions in Infertile Azoospermic Men at A Swedish Andrology Centre. *International Journal of Andrology*, 23 (4) : 225-229.
- Page, D.C, 2002. Germ Cells and Sex Chromosome in Mammals. In *The Lab*. Howard Hughes Medical Institute.

- Page, D.C. Silber-Sherman. Brown-Laura G, 1999. Men with Infertility Caused by AZFc Deletion can Produce Sons by ICSI but are Likely to Transmit The Deletion and Infertility. *Human Reproduction*, 14 : 1722-1726.
- Pears RV II, Drolet W, Kalla KA, et al., 1997. Reduced fertility in Mice Deficient for The POU Protein Sperm-1. *Proceedings of The National Academy of Sciences USA*, 94 : 7555-60.
- Pryor, J.L. Kent-First, M. Muallem, A. Van Bergen, A.H. Nolten, W.E. Meisner, L. Roberts, K.P., 1997. Microdeletion in The, Y Chromosome of Infertile Men. *New England Journal of Medicine*, 336 : 534-539.
- Raicu F., Popa L., Apostol P., Cimponeriu D., Dan L., Ilinca E., Dracea LL., Marinescu B., Gavrilă L, 2003. Screening for microdeletions in human Y chromosome – AZF candidate genes and male infertility. *J.Cell.Mol.Med*, 7 (1) : 43 –48.
- Reijo, R. Lee, T.Y. Salo, P. Alagappan, R. Brown, L.G. Rosenberg, M. Rozen, S. Jaffe, T. Straus, D. Hovatta, O. de la Chapelle, A. Silber, S & Page. D.C. , 1995. Diverse Spermatogenic Defects in Human Caused by Y Chromosome Deletion Encompassing A Novel RNA-binding Protein Gene. *Natural Genetics*, 10 : 383-393.
- Rudan I., Rudan D., Campbell H., Carothers A., Wright A., Smolej-Narancic, Janicijevic B., Jin L., Chakraborty R., Deka R., Rudan P, 2003. Inbreeding and Risk of Late Onset Complex Disease. *J.Med.Genet*, 40: 925 – 932.
- Ruggiu & Cook, 1999. Y Bind-RNA for Spermatogenesis ? *International Journal of Andrology*, 22 (1) :19-27.
- Ruiz-Pesini E, Lapena A, Diez-Sanches C, Perez-Martos A, Montoya J, Alvares E, Diaz M, Urries A, Montoro L, Lopez-Peres MJ dan Enriquez JA, 2000. Human mtDNA haplogroup associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am J. Hum. Genet.*, 67 : 682 – 696.
- Seifer, I. Amat, S. Delgado-Viscogliosi, P. Boucher, D. Bignon YJ, 1999. Screening for Microdeletions on The Long Arm of Chromosome Y in 53 Infertile Men. *International Journal of Andrology*. 22 (3) : 148-154.
- Simoni, M. Gromoll, J. Dworniczak, B. Rolf, C. Abshagen, K. Kamischeke, A. Carani, C. Meschede, D. Behre, H.N. Horst, J. Nieschlag E, 1997. Screening for Deletion of The Y Chromosome Involving The *DAZ* (Deleted in Azoospermia) Gene in Azoospermia and Severe. *Fertility & Sterility*, 67 : 542-547.
- Strachan T., Read AP, 2001. Studying human chromosomes. In: *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Pub., Second ed., pp: 43 – 53.

- Sudarto, 1997. Induksi ovulasi pada PCO. Dalam Forum Komunikasi Reproduksi, Denpasar, 6 – 8 Nopember, hal. E-3
- Team Research Jurusan Anthropologi, 1975. Desa Adat Tengan Pegringsingan (Suatu Pengantar Umum yang Deskriptif). Oleh Jurusan Anthropologi fakultas Sastra, Universitas Udayana. Hal.: 8 – 38.
- Tiepolo, L.. & Zuffardi O, 1976. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, 34 : 119 – 124.
- Tim Tata Ruang Desa Adat Tenganan Pegringsingan, 2001. Draft Usulan Rencana Pengelolaan Ruang dan Kawasan Desa Adat Tenganan Pegringsingan Kecamatan Manggis, Kabupaten dati II Karangasem-Bali. Hal.: 1 – 10.
- Tse, J.Y.M.WSB. Yeung. EYL. Lau. EHY. Ng. WWK. So. PC. Ho, 2000. Deletions within The Azoospermia Factor Subregions of The Y Chromosome in Hongkong Chinese Men with Severe Male .Factor Infertility: Controlled Clinical Study. *Hongkong Medical Journal*, 6 (2) : 143-146.
- Vaessen M, 1984. Childlessness and Infecundity. WFS Comparative Studies, Note 2, Series 31, Cross National Summaries, International Statistic Institute, Voorburg, The Netherlands
- Valetto A., Bertini V., Rapalini E., Simi P, 2005. A 46,XX SRY-negative man with complete virilization and infertility as the main anomaly. *Fertil. Steril*, Jan. 83, 1: 216 – 219.
- Van der Ven K, Montag M, Peschka B. et al., 1977. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Hum Reprod*, 3 : 699 – 704.
- Vernole P., Terrinoni A., Didona B., De Laurensi V., Rossi P., Melino G., Grimaldi P, 2000. An SRY-negative XX male with Huriez syndrome. *Clin Genet*, Jan 57 (1): 61-66.
- Vogt PH, 1999. Y Chromosome and Single Gene Defects that Cause Male Infertility. In Robert Jansen and David Martinez. *Toward Reproductive Certainty - Fertility and Genetic Beyond*. The Parthemon Publising Group. NewYork - London.
- Vogt, P.H. Edelman, A. Kirsch, S. Henegariu, O. Hirschmann, P. Kiesewetter, F. Kohn, F.M. Schill, W.B. Farah, S. Ramos, C. Hartmann, M. Hartschuh, W. Meschede, D. Behre, H.M. Castel, A. Nieschlag, E. Weidner, W. Grone, H.J. Jung, A. Engel, W. & Haidl, G., 1996. Human Y Chromosome Azoospermia Factor (AZF) Mapped to Different Sub-region in Yg11. *Human Molecular Genetics*, 5 : 933-943.

- Wilson, J.D. Foster, D.W. Kronenberg HM, Larsen PR. 1998. William Textbook of Endocrinology. WB Saunders Company. Philadelphia.
- Winarso H, 2004. Prevalensi Diabetes mellitus pada masyarakat pelaku kawin kerabat (Studi di desa adat Tenganan Pegringsingan, Kab. Karangasem, Propinsi Bali. Belum dipublikasi.
- Winarso H, 2004. Asam urat dan bengkak sendi pada masyarakat pelaku kawin kerabat (Studi di desa adat Tenganan Pegringsingan, Kab. Karangasem, Propinsi Bali). Belum dipublikasi.
- Yen PH, 1998. A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome : a region frequently deleted in azoospermic males. *Genomics*, 54 : 5 – 12.
- Yen PH, 1999. Advances in Y chromosome mapping. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 11 : 275 – 281.
- Yen, P.H. Li, X.M. Tsai, S.P. Johnson, C. Mohandas, T. Shapiro LJ, 1990. Frequent Deletions of The Human X Chromosome Distal Short Arm Result from Recombination beetwen Low Copy Repetitive Elements. *Cell*, 61 : 603-610.





**LAMPIRAN**

Lampiran 1  
Data Subyek Penelitian

No	Umur	SRY	RBM	DAZ	LH mIU/ml	FSH mIU/ml	Testosteron ng/dl	Vol. Testis (ml)	Vol. Sperma (ml)	Konsent. (juta/ml)	Motilitas (%)				Morfologi Normal (%)
											a	b	c	d	
1*	57	+	+	+	6.36	15.5	297.4	14/14	2,4	6,4	0	0	0	100**	7
2	42	+	+	+	2.85	3.4	537.1	16/14	3,5	14	5	20	30	45	18
3	34	+	+	+	4.54	9.14	411.7	19/16	3,2	22	5	35	20	40	16
4*	29	-	-	-	3.23	5.01	416.2	14/14	2,6	3,2	0	20	30	50	9
5	62	+	+	-	30.4	88.4	118.6	14/12							
6*	43	+	+	+	5.61	2.37	210.2	16/12	2,3	10	0	0	0	100**	11
7	37	+	-	+	4.02	5.75	413.9	16/14	3,2	14	0	30	35	35	8
8	38	+	+	+	3.83	6.5	469.8	19/16	3,2	26,2	10	30	30	30	22
9	54	+	+	+	7.39	14.5	372.4	14/12	2,4	7,2	0	0	0	100**	14
10*	45	+	-	+	21	51.1	212.2	14/12	3,0	4,4	0	0	0	100**	13
11	44	+	-	-	4.4	4.3	232.3	19/14	3,1	9,6	0	0	0	100**	9
12	54	+	-	-	13.8	17	276.5	14/14							
13*	62	+	-	-	6.79	5.21	424.9	16/14							
14	59	+	-	-	4.74	3.96	372.5	14/12							
15*	60	+	-	-	4.79	16.1	398.9	14/14							
16	43	+	-	-	5.46	8.21	298.6	16/14	2,5	7,5	0	0	0	100**	12
17*	56	+	-	-	6.92	12.2	202.6	14/12							
18*	36	+	-	-	3.73	1.52	246.3	16/16	2,6	4,7	0	0	0	100**	11
19	38	+	-	-	3.32	2.58	488.7	16/12	2,8	5,6	0	0	0	100**	8
20	33	+	+	+	6.26	2.14	337.1	16/16	3,2	14,2	0	0	0	100**	16

## Catatan:

- = Terdapat deflesi

\* = Infertilitas Primer

\*\* = Diamampung dengan kondom, dianalisa &gt; 6 jam setelah ejakulasi

**Lampiran 2**  
**Populasi Penduduk Desa Tenganan**  
**(1962 - 1994 dan 2004)**

<b>Waktu</b>	<b>Laki-laki</b>	<b>Wanita</b>	<b>Total</b>
31/12/62	132	145	277
31/12/63	132	145	277
31/12/64	138	149	287
31/12/65	136	146	282
31/12/66	131	141	272
31/12/67	133	144	277
31/12/68	126	143	269
31/12/69	129	142	271
31/12/70	131	138	269
31/12/71	132	140	272
31/12/72	132	142	274
31/12/73	137	145	282
31/12/74	138	147	285
31/12/75	138	150	288
31/12/76	137	154	291
31/12/77	137	150	287
31/12/78	138	153	291
31/12/79	137	152	289
31/12/80	142	148	290
31/12/81	137	148	285
31/12/82	141	152	293
31/12/83	142	150	292
31/12/84	144	149	293
31/12/85	150	152	302
31/12/86	149	154	303
31/12/87	149	153	302
31/12/88	152	150	302
31/12/89	157	151	308
31/12/90	158	152	310
31/12/91	157	155	312
31/12/92	160	155	315
31/12/93	161	155	316
31/12/94	163	154	317
6/12/04	184	125	309

Data 1962 - 1994 dikutip dari Breguet G. (1995)

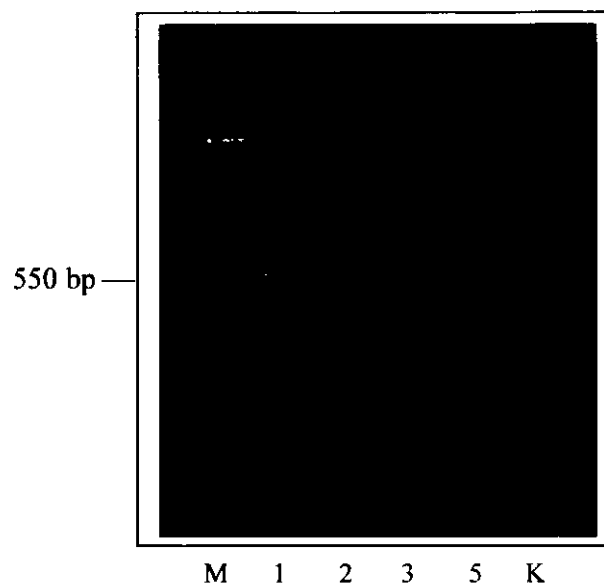


Lampiran 3  
Laju Fertilitas 1963 - 1994 dan 2004

<b>TENGANAN</b>	<b>63-66</b>	<b>67-70</b>	<b>71-74</b>	<b>75-78</b>	<b>79-82</b>	<b>83-86</b>	<b>87-90</b>	<b>91-94</b>	<b>2001-2004</b>
Jumlah Kelahiran (a)	33	26	28	17	15	19	22	22	15
Jumlah Wanita Umur 15 - 49 th (b)	75	70	71.5	72.5	75	81	83.5	84	73
Jumlah Wanita Umur 20 - 34 th (c)	34	31.5	30.5	30.5	33.5	37	40	43	32
Laju Fertilitas Global (a/b)	0.44	0.37	0.39	0.23	0.2	0.23	0.26	0.26	0.2
Laju Fertilitas Selektif (a/c)	0.97	0.83	0.92	0.56	0.45	0.51	0.55	0.51	0.47

Data tahun 1963 - 1994 dikutip dari Braguët G. (1995)

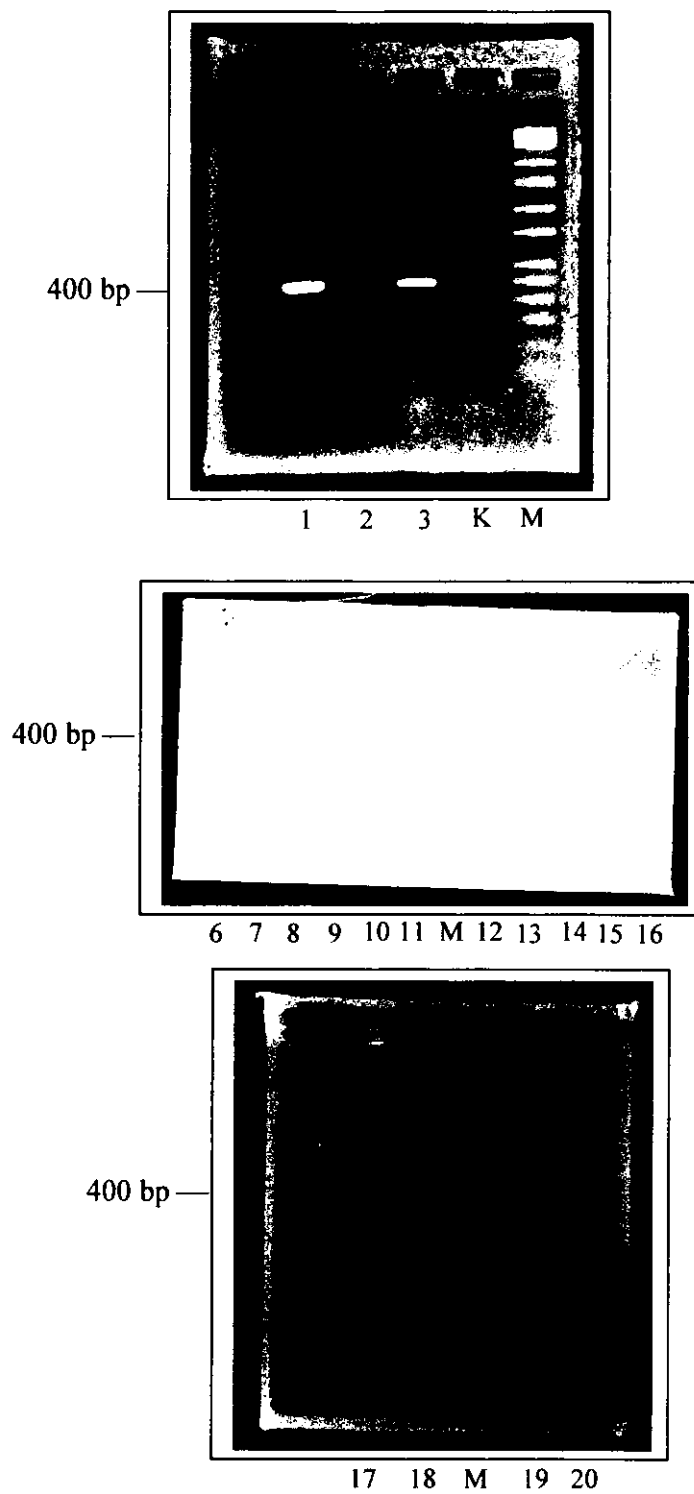
## Lampiran 4 : Visualisasi hasil PCR untuk STS-RBM



Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-RBM* menggunakan *Wide Range DNA Marker* (Subyek 1, 2, 3 dan 5)

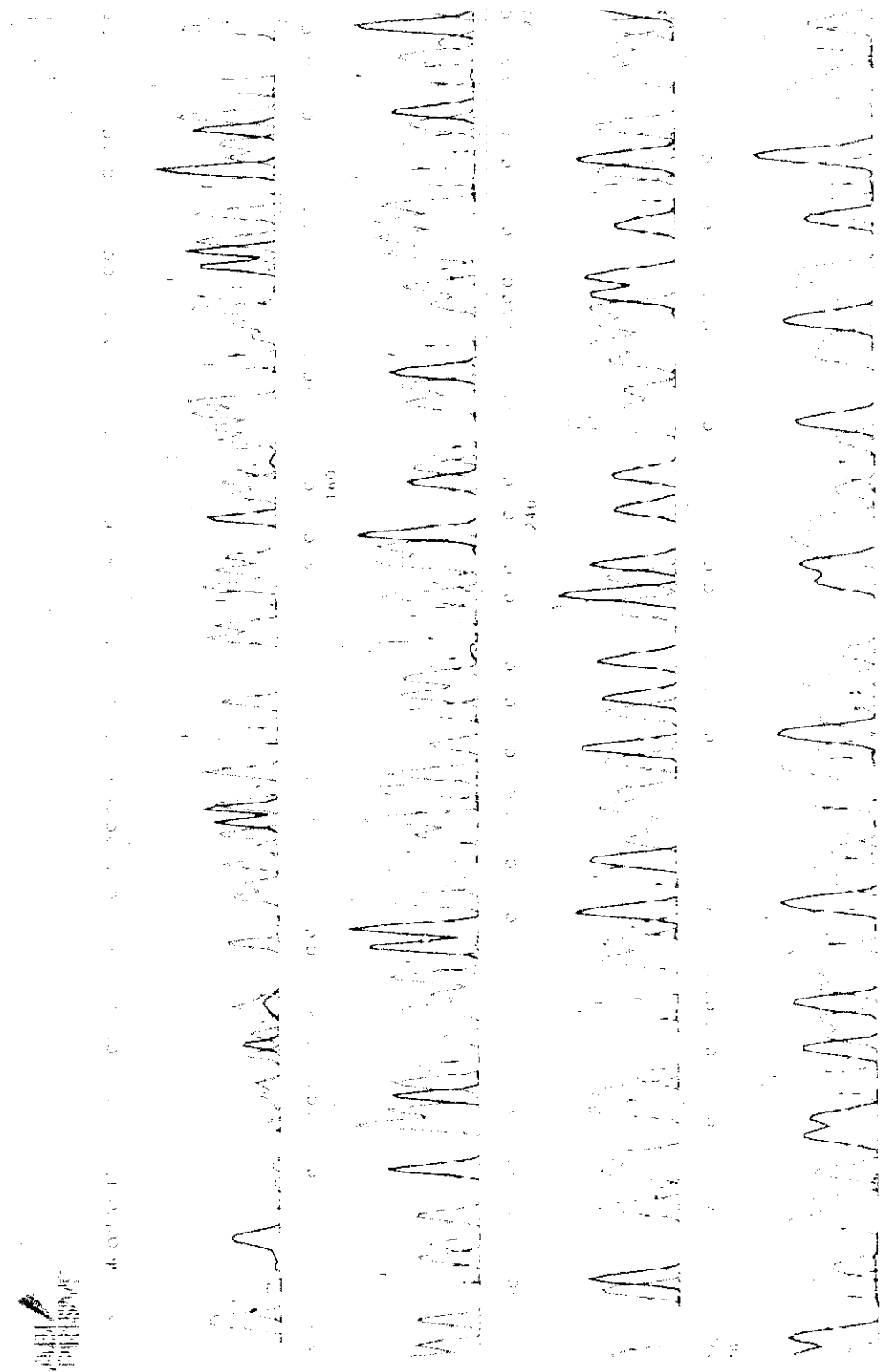
**Keterangan :**

- M = Standard  
K = Kontrol Negatif  
1, 2, 3, 5 = *RBM* Positif (*Sample*)

Lampiran 5 : Visualisasi hasil PCR untuk STS-*DAZ***Keterangan :**M = *Standard*

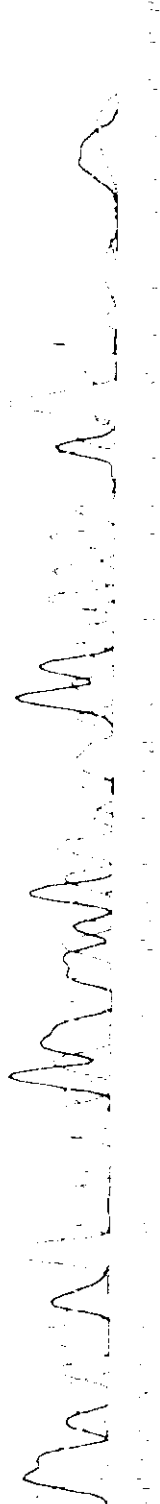
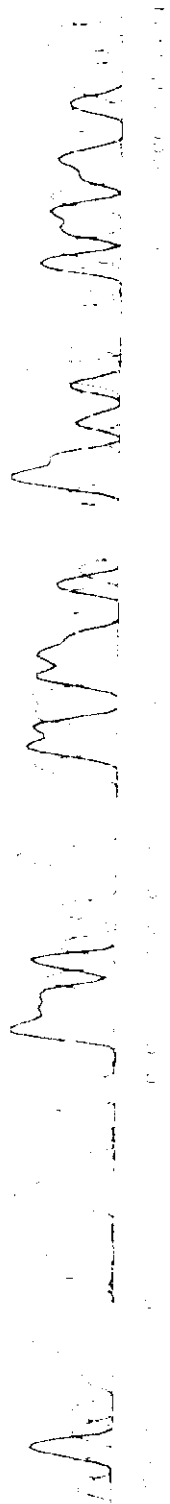
K = Kontrol Negatif

Lampiran 6 : Hasil Sekuensing gen RBM Tanganan Pegringsingan





417



Vertical text on the right side of the page, possibly a label or a list of items, which is mostly illegible due to the image quality.

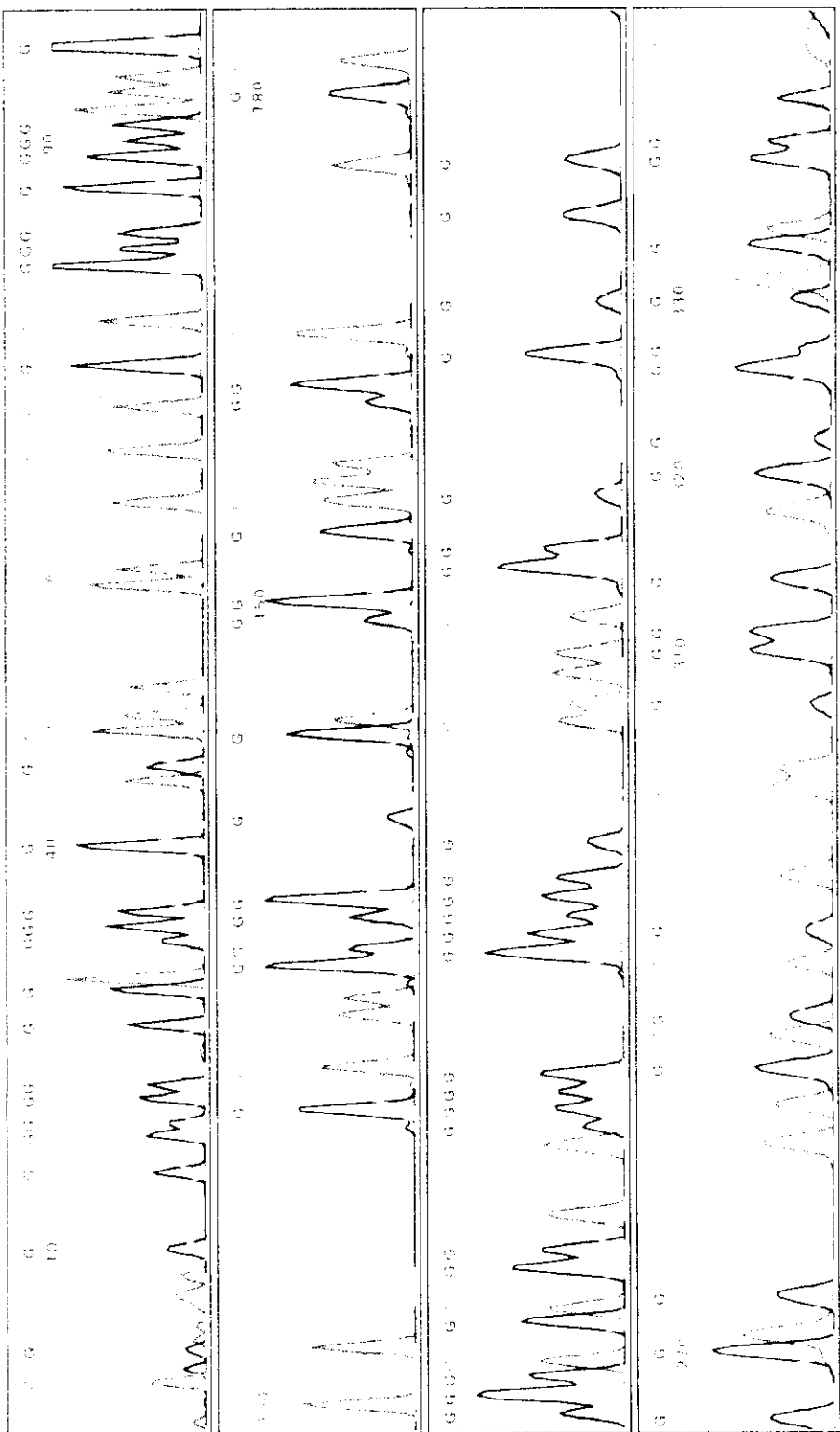
Lampiran 7 : Hasil Sekuensing gen DAZ Tenganan Pegringsingan

Model 310  
 Version 3.0  
 AIB Cl 1  
 Version 3.0

Jr. Hudi W / DAZ P. ISampoket  
 IP Hudi W / DAZ P. ISampoket  
 Date 11

Signal G: 523 A 301 1 727 1.294  
 UT POPRAD Set-App Primer  
 Matrix V 1 1  
 Points 1165 to 9286 Base 1 1180  
 Spacing 12.921298

Page 1 of 3  
 18. Mar Oct 2001 11:32 AM  
 14. Thu Oct 2001 2:31 AM



**Lampiran 8 : Lembar Persetujuan Subyek****LEMBAR PERSETUJUAN**

Yang bertanda-tangan di bawah ini saya :

N a m a : \_\_\_\_\_

Jenis Kelamin : \_\_\_\_\_

Umur : \_\_\_\_\_

Alamat : \_\_\_\_\_

Telah mendapat penjelasan yang cukup tentang penelitian : **IDENTIFIKASI DELESI KROMOSOM Y PRIA PASANGAN INFERTIL DALAM MASYARAKAT PELAKU KAWIN KERABAT**

Bahwa saya bersedia ikut dalam penelitian tersebut di atas.

Juga sewaktu-waktu saya boleh untuk berhenti terlibat dalam penelitian ini.

Tenganan,

Penanggung Jawab Penelitian

Saya,

**dr. Hudi Winarso, M.Kes., Sp.And.**

.....

**Lampiran 9 : Kuesioner****A. IDENTITAS SUBYEK**

Nama Suami : Umur :

Alamat :

Nama Istri : Umur :

Lama menikah :

Hubungan seks : per minggu

**B. ISTRI**

Apakah pernah mengalami keguguran : ya / tidak

Kalau ya, deskripsikan : ....

Pola menstruasinya:

Siklus : teratur / Tidak teratur

Tiap berapa hari :

Berat badan : kg

**C. SUAMI**

Penyakit yang pernah dialami :

Penyakit menular seks :

Varikokel :

Testis : Skrotum :

**D. KAWIN KERABAT**

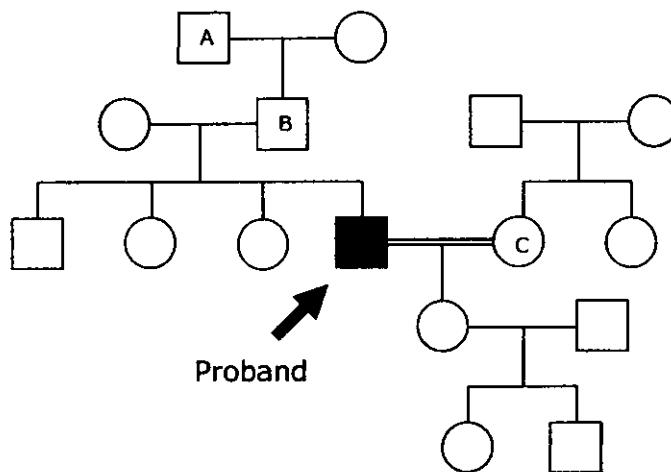
Pedigre:



## Lampiran 10 : Pedigree

**KASUS NO : 5**

SRY Positif; RBM Positif; DAZ Negatif; Infertilitas Sekunder



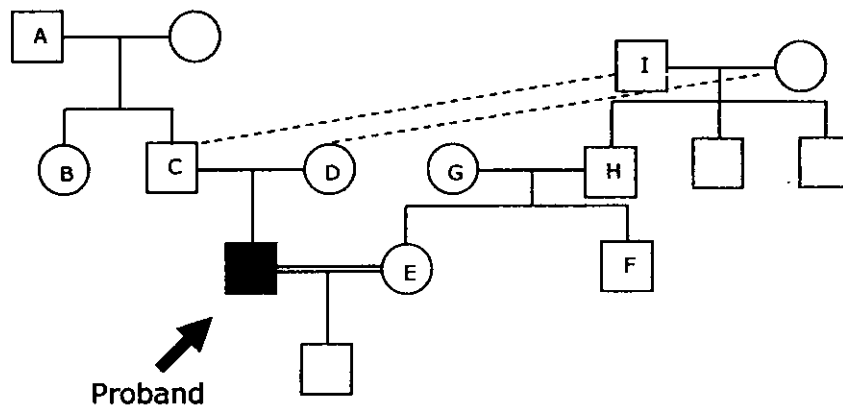
A = I Parna

B = I Siarta

C = Ni Turi

**KASUS NO : 9**

SRY Positif; RBM Positif; DAZ Positif; Infertilitas Sekunder

**Keterangan :**

----- = Sepupu

A = I Tinggal

B = Ni Rawig

C = I Gelgel

D = Ni Semer

E = Ni Srinti

F = I Timur

G = Ni Montel

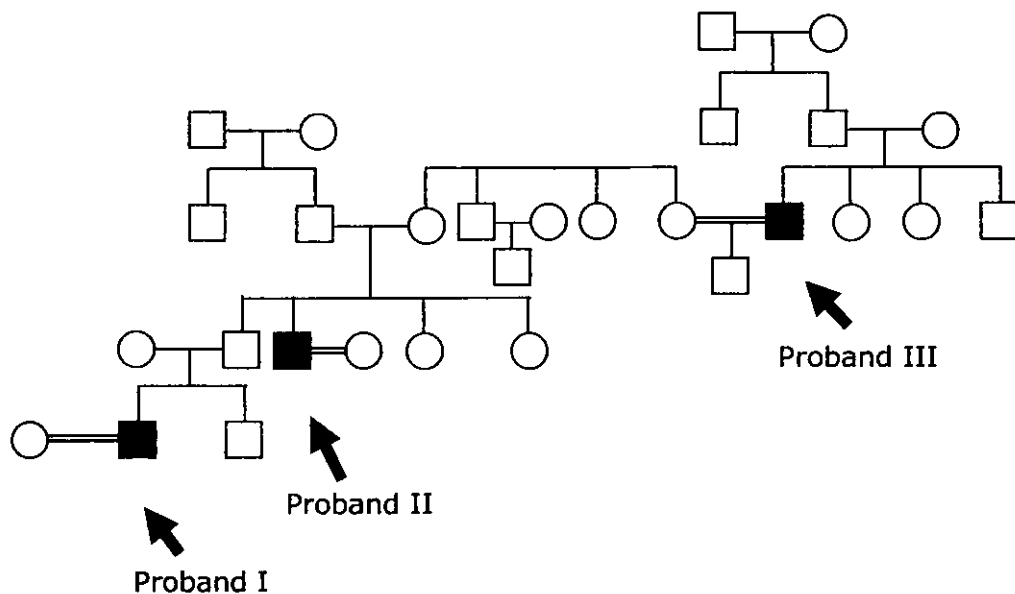
H = I Tiu

I = I Gogoh

Perkawinan = "Keponakan Mindon"

**KASUS NO : 4**

SRY Negatif; RBM Negatif; DAZ Negatif; Infertilitas Primer



Proband II : Kasus No : 1

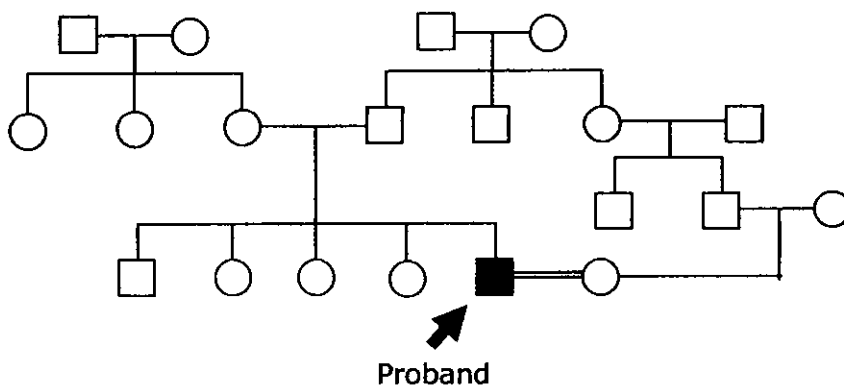
SRY Positif, RBM Negatif, DAZ Positif, Infertilitas Primer

Proband III : Kasus No : 12

SRY Positif, RBM Negatif, DAZ Negatif, Infertilitas Sekunder

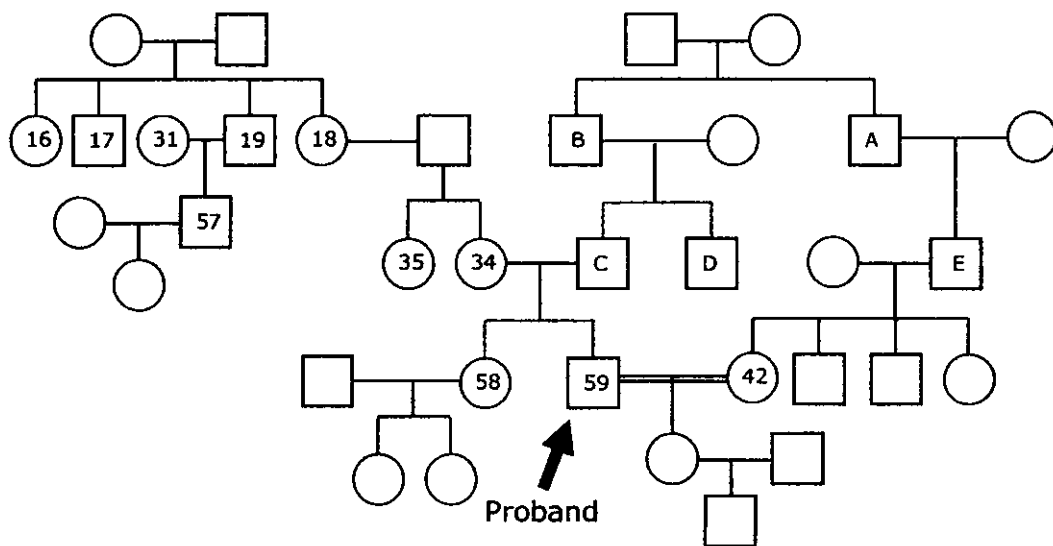
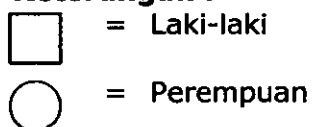
**KASUS NO : 13**

SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif; Infertilitas Primer



**KASUS NO : 14**

SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif

**Keterangan :**

A = I Karti  
B = I Rasmin  
C = I Tangguh  
D = I Sija  
E = I Rumi

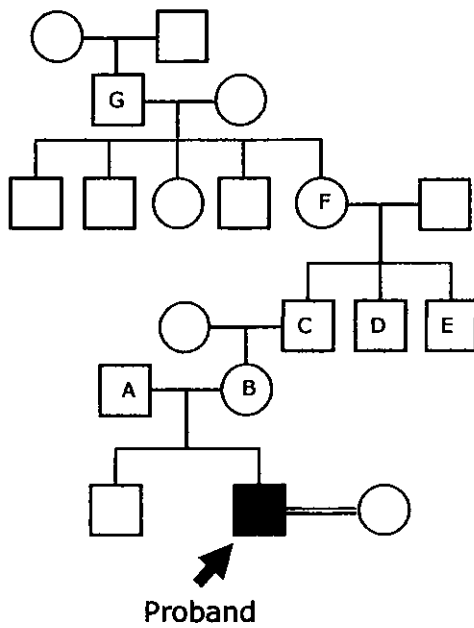
5 = I Jumput  
16 = Ni Liwat  
17 = I Langgeng  
18 = Ni Dapet  
19 = I Reneng  
33 = Ni Reneng

34 = Ni Suji  
35 = Ni Wati  
42 = Ni Murta  
57 = I Tanggun  
58 = Ni Swirya  
59 = I Widyana

59 - 42 = Mindon

**KASUS NO : 16**

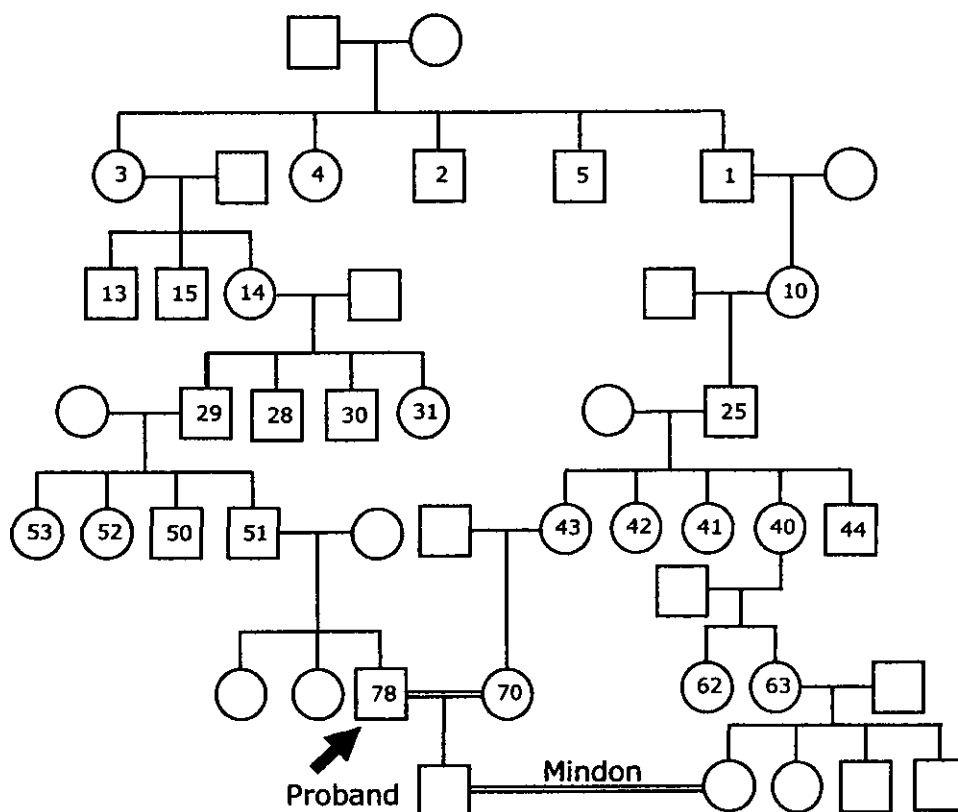
SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif; Infertilitas Primer

**Keterangan :**

- A = I Latri
- B = Ni Latri
- C = I Janta
- D = I Sukrasi
- E = I Diantri
- F = Ni Karsa
- G = I Darna

**KASUS NO : 17**

SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif

**Keterangan :**

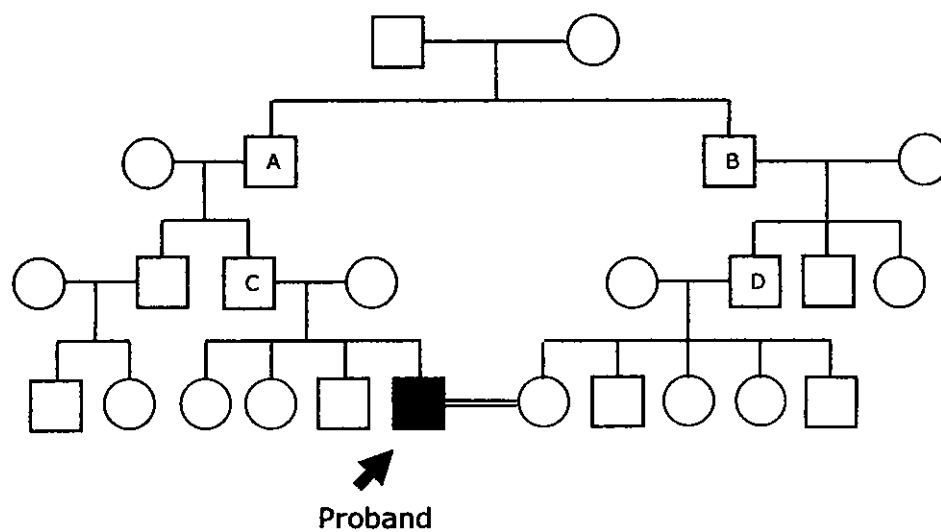
□ = Laki-laki



○ = Perempuan

- |                  |                 |
|------------------|-----------------|
| 1 = I Nganti     | 40 = Ni Darmi   |
| 2 = I Cong Kasub | 41 = Ni Catra   |
| 3 = Ni Kegep     | 42 = Ni Murta   |
| 4 = Ni Peset     | 43 = Ni Diarna  |
| 5 = I Jumput     | 44 = I Suparka  |
| 10 = Ni Timut    | 50 = I Dami     |
| 13 = I Lingseh   | 51 = I Dani     |
| 14 = Ni Rania    | 52 = Ni Sania   |
| 15 = I Celos     | 53 = Ni Dana    |
| 25 = Ni Darpa    | 62 = Ni Yudhana |
| 28 = I Cedig     | 63 = Ni Landri  |
| 29 = I Karya     | 70 = Ni Dipta   |
| 31 = Ni Sereng   | 78 = I Dipta    |

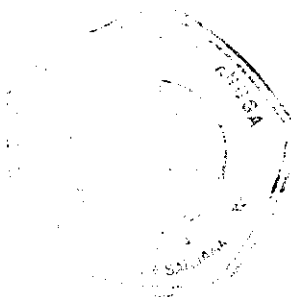
**KASUS NO : 18**

SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif; Infertilitas Primer

**Perkawinan : "Mingtelu"****Keterangan :**

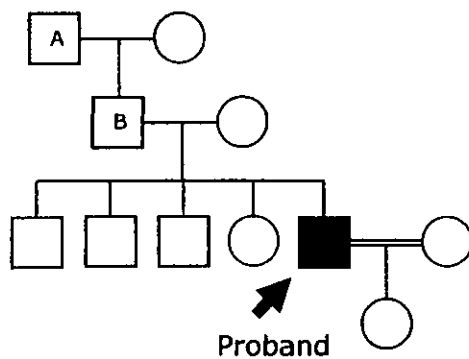
-  = Laki-laki  
 = Perempuan

- A = I Rempin  
 B = I Sigra  
 C = I Nuradi



**KASUS NO : 19**

SRY Positif; RBM Negatif; DAZ Negatif; Infertilitas Primer

**Perkawinan : "Mingtelu"****Keterangan :**

□ = Laki-laki

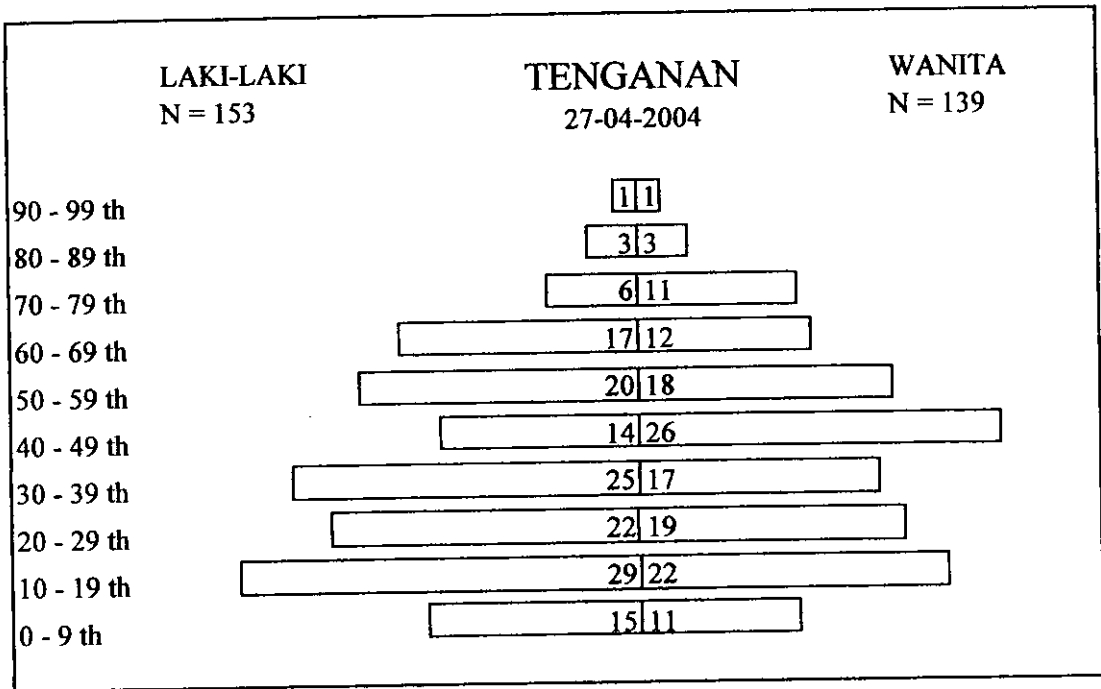
○ = Perempuan

Ayahnya merupakan anak tunggal

A = Wayan Lali

B = Ng. Kantor

Piramida Penduduk Desa Tenganan (27-04-2004)







DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
**LEMBAGA PENELITIAN**

- |  |                                       |  |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional         | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional             | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi                 |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga                   |  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)   | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066  
E-mail : lpunair@rad.net.id - <http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223>

**KOMISI ETIKA PENELITIAN  
LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
(ETHICAL CLEARANCE)  
NO. 007/PANEC/LEMLIT/2004**

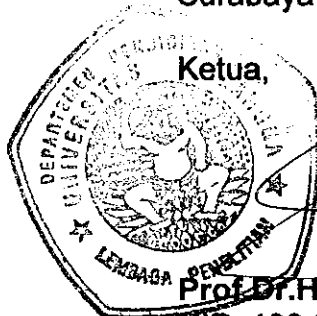
Panitia Kelaikan Etik Penelitian Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya, setelah mempelajari dan mengkaji secara seksama rancangan penelitian yang diusulkan, maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian yang berjudul:

**Identifikasi Delesi Kromosom Y Pria Pasangan Infertil  
Pada Masyarakat Pelaku Kawin Kerabat  
(Studi di Desa adat Tenganan, Kabupaten Karangasem, Propinsi Bali)**

Peneliti Utama : dr. Hudi Winarso, M.Kes. Sp.And.  
Unit/Lab. Tempat Penelitian : Desa Adat Tenganan, Kabupaten Karangasem  
Propinsi Bali

**DINYATAKAN LAIK ETIK**

Surabaya, 13 Desember 2004



Ketua,  
*[Signature]*  
Prof. Dr. H. Soedibjo Hari Poernomo, dr., DTMH.  
NIP. 130 359 279