

**ABSTRACT**

**THE POTENTIAL OF  $\Delta$ F 508-T GEN MUTANT THE CODING OF  
CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE CONDUCTANCE  
REGULATOR (CFTR) AS PROTOTYPE AT THE CONGENITAL  
BILATERAL ABSENCE OF VAS DIFERENS (CBAVD) DISEASE IN  
INDONESIA**

CBAVD is congenital defect, data concerning the report of CBAVD case have not been reporting in Indonesia. The aim of this research to determine potency mutan  $\Delta$ F 508-T gene CFTR could be used as prototype for therapy congenital defect CBAVD in Indonesia. Blood sample from Azoospermi man was collected and measured by R Neacy-QIAGENKit to compare their quality. Three different primers were used in this research. The result of SDS-PAGE method was positive to find molecular weight CFTR protein in CBAVD patient. The result of research showed that man with CBAVD have level base pair on 400bp in CBAVD patient in Indonesia, detection of Adenovirus was negative by PCR, this support that was truly congenital disease, The result of SDS\_PAGE to measure molecular weight CFTR protein were 190-250kDA, 170-180k Da, 140-160kDA and 120kDa and the score of Immunoglobuline G was 15579 mg/dl measured by Cobas C6000 Immunoturbidimetri. The level base pair on 400 bp of DNA mutant  $\Delta$ F 508-T gene Code CFTR will guide strategies for developing new therapeutics and alternative therapy toward defect congenital CBAVD in Indonesia.

**Keywords:** CBAVD, mutant  $\Delta$ F 508-T, CFTR

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1. Latar Belakang Masalah

Cacat lahir (*congenital defect* atau *congenital condition*) adalah kelainan yang muncul pada saat lahir dan dapat menyebabkan kecacatan fisik atau mental atau kematian. Cacat lahir umumnya dapat dideteksi pada masa prenatal. Akan tetapi bila hal ini tidak terdeteksi pada masa prenatal dapat diketahui dari pemeriksaan pasca natal. Akan tetapi ada juga cacat lahir yang tidak terdeteksi hingga masa anak-anak bahkan hingga dewasa. *Congenital Bilateral Advance Vass Deferens* (CBAVD) adalah salah satu cacat lahir dengan ciri azoospermia. Angka kejadian CBAVD memang sangat kecil sekitar 2-10%. Namun apabila tidak ditangani, akan memicu masalah terutama keutuhan suatu rumah tangga. Infertilitas yang ditandai dengan azoospermia dapat dikoreksi melalui tindakan bedah dan non bedah. Akan tetapi tindakan bedah masih memerlukan pengalaman dan riset lebih jauh. Selain itu banyak juga cacat lahir yang tidak dapat diterapi atau meninggal pada usia yang dini. Cacat lahir yang menyebabkan terjadinya gangguan mental akan berlangsung terus menerus sepanjang hidup.

Cacat lahir ini dapat berdampak pada kelainan struktur, fungsi atau metabolisme. Setiap tahun kira-kira 7,9 juta anak di seluruh dunia (kira-kira 6% dari seluruh kelahiran di dunia) dilahirkan dengan cacat lahir yang serius akibat kelainan genetik atau penyebab pasca konsepsi lainnya seperti alkohol, rubella, sifilis, defisiensi

yodium dan sebagainya. Menurut *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, di Amerika Serikat setiap tahun terdapat kira-kira 3% dari anak yang lahir menderita berbagai jenis cacat lahir dan kira-kira 1 dari setiap 5 bayi dengan cacat lahir tersebut akan mengalami kematian pada tahun pertama kehidupan. Kasus penyakit congenital CBAVD di Indonesia masih belum ada datanya. Dengan berkembangnya teknik rekayasa jaringan di dunia saat ini terutama dengan telah dapat dibuktikannya *human Amnion Mesenchymal Stem Cell (hA-MS)* untuk meregenerasi cacat genetik akibat mutasi gen, maka akan terbuka kemungkinan pemulihan penderita CBAVD dengan tingkat keberhasilan yang tinggi dan morbiditas yang relatif rendah. Infertilitas pada pria masih merupakan kasus yang belum tuntas untuk ditangani dalam Ilmu Kedokteran. Sehingga tidak hanya dipentingkan untuk dilakukan tes genetik saja pada penderita, namun identifikasi etiologi serta konseling sudah harus disosialisasikan untuk mencegah transmisi cacat genetik melalui *Assisted Reproductive Technology (ART)*. Diharapkan dengan digalakkan ART atau Teknologi Reproduksi Berbantu akan semakin ditingkatkan evaluasi tentang kasus infertilitas pada pria baik sindrom maupun non sindrom melalui tes diagnostik (Dada, 2011). Penyebab kasus infertilitas pada pria telah diteliti oleh Hotchkiss sejak tahun 1944, melalui berbagai penelitian yang telah dilakukan sampai pada akhirnya ditemukan kasus CBAVD di Amerika Selatan oleh Michelson *et al.*, 1949. Data rekomendasi berbagai variasi tes genetik kasus infertilitas dengan difokuskan pada hasil pemeriksaan spermatozoa yang abnormal baik kuantitas maupun kualitas yang disebabkan oleh mutasi genetik

berdasarkan fenotip dan genotipnya adalah penderita CBAVD (67%) dengan disertai adanya (CFTR) (Dada, 2011).

Perkembangan penelitian tentang CBAVD di tingkat internasional telah dimulai sejak tahun 1968, dengan ditemukannya seorang pria Amerika yang meninggal dengan sebab adanya abses yang membesar di *scrotum* dan terbentuknya sistik fibrosis yang sudah metastasis berbagai organ, utamanya: pankreas, paru-paru, liver, yang diduga meninggalnya berhubungan dengan immunodefisiensi (Wang *et al.*, 2002). Di Washington kasus CBAVD lebih banyak didominasi oleh orang kulit putih, bertolak dari kasus-kasus tersebut dilakukan riset pada tahun 1983 di Pasteur Institute dan ditemukan bahwa kemungkinan penyebab kasus tersebut adalah CBAVD. Riset diagnostik dikembangkan sehingga ditemukannya Genetik *test kit* yang diakui oleh *Food Drug Administration* (FDA) di Robert Gallos laboratorium pada tahun 1985. Pengembangan program skrening telah digalakkan sesuai dengan tingkat melajunya kasus CBAVD dengan dilakukannya “*Preconception and Prenatal Carrier Screening for Cystic fibrosis*” pada tahun 2001 untuk penderita *carrier* CBAVD. Hal tersebut juga dilakukan pada bayi yang baru dilahirkan untuk dilakukan *Newborn Screening* melalui “*Initial Screening test level of IRT (Immunoreactive Trypsinogen)*”. Ditemukannya diagnostik melalui ART untuk CBAVD, maka mulai dikembangkan penelitian untuk terapi CBAVD. Pada tahun 1989 ditemukan “*Gene Testing Going Mainstream*” untuk mendeteksi adanya mutasi gen yang disebabkan oleh Sistik Fibrosis pada orang kulit putih di Washington (Wilschanski *et al.*, 2000). Sedikitnya 97% kasus Sistik Fibrosis pada laki laki dengan kondisi infertil tetapi tidak steril

karena terjadi obstruksi pada *ductus efferent* dan tidak berkembangnya *ductus deferens*, akibatnya berpotensi terjadinya oligospermia, teratospermia, dan oligoastheno spermia. *Congenital Bilateral absence of Vas Deferens* (CBAVD) dapat menurunkan volumen spermatozoa yang berlanjut menyebabkan infertilitas, sehingga dapat menurunkan angka kebuntingan. Akan tetapi ART juga memiliki kelemahan yaitu bahwa harus dilakukan suplementasi progenitor pada delesi gen yang telah dikloning untuk merancang prototipe pada penyakit CBAVD. Di samping itu apabila kasus CBAVD lama tidak cepat ditangani, maka akan berakibat pada mortalitas karena sistik fibrosis sudah mengalami metástasis keberbagai organ sebagai akibat dari mutasi gen. *CFTR* mutan  $\Delta F$  508-T adalah *CFTR* yang telah dilakukan *delesi* dari phenylalanine pada posisi 508 basa nukleotida dari protein *CFTR* gen pengkode pada regio 554-576, sehingga akan didapatkan urutan asam amino Isoleucine-Isoleucine-Glycine-Valine dari yang sebelumnya Isoleucine-Isoleucine-Phenylalanine-Glycine-Valine dan urutan nukleotidanya adalah ATC-ATT-GGT-GTT dari yang sebelumnya ATC-ATC-CTT-TTT-GGT-GTT (Cheng *et al.*, 1990).

Terapi dengan *Mesenchymal Stem Cell* dari membran amnion tersebut diharapkan dapat meregenerasi sel dan *renewal* sel yang menyusun jaringan *vas deferens* dan sel dinding tubulus seminiferus yang mengalami cacat atau abnormal, dengan pembentukan sel dan jaringan baru yang kualitasnya sama dengan *vas deferens* dan dinding tubulus seminiferus untuk menghasilkan spermatogonium pada penderita CBAVD. Dengan alasan tersebut diatas maka dicari alternatif lain dengan harapan Limfosit juga akan berperan dalam hal resisten terhadap infeksi sekunder

pada kasus CBAVD yang tidak tertangani secara cepat dan tepat. Keberhasilan penelitian ini dapat memberikan solusi terhadap problem cacat kongenital CBAVD akibat mutasi  $\Delta F 508-T$  gen pengkode CFTR, terapi *mesenchymal stem cell* ini dipilih karena berbagai hal, yaitu : pertama, terapi bedah dengan tujuan rekonstruksi akan mengatasi permasalahan; kedua, karena belum adanya terapi untuk eradikasi melisiskan mucus pada Sistik Fibrosis; ketiga, adalah mekanisme patogenesis yang sepenuhnya belum dapat diungkapkan; serta yang terakhir karena terapi dengan ART yang selama ini digunakan belum dapat mencegah pembentukan Sistik Fibrosis yang progresif, tetapi hanya memperlambat laju replikasi. Diharapkan dengan terapi *stem cell* tingkat morbiditas akan menurun pada penderita CBAVD dibandingkan dengan teknik ART yang selama ini digunakan melalui MESA, PESA, TESE, ICSI dan donor sperma.

## 1.2. Rumusan masalah

Apakah transfeksi mutan  $\Delta F 508-T$  gen pengkode CFTR pada *Amniotic Mesenchymal Stem Cell* dapat dipakai sebagai prototype anti Sistik Fibrosis untuk terapi cacat kongenital CBAVD di Indonesia?

### **1.3. Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1. Tujuan umum**

Tujuan peneliti ingin mengeksplorasi potensi *Mesenchymal Stem Cell* sebagai prototipe anti Sistik Fibrosis untuk terapi cacat kongenital CBAVD di Indonesia.

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

1. Preparasi spermatozoa dari penderita azoospermia sebagai sampel penderita CBAVD.
2. Mengamplifikasi cDNA gen dari penderita CBAVD.
3. Mengkarakterisasi fragmen DNA gen dari penderita CBAVD.
4. Mengisolasi mRNA gen dari penderita CBAVD.
5. Mengetahui ukuran molekul DNA target gen dari penderita CBAVD.
6. Membuktikan fluktuasi RNA mutan F- 508 dengan menggunakan variasi primer.
7. Menganalisis ekspresi *Focus Forming Unit* (FFU) dari gen pengkode CFTR , kloning, sub kloning ke dalam *Mesenchymal Stem Cell*.

### **1.4. Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1. Manfaat teoritis**

1. Memberikan informasi baru bahwa CFTR berperan penting dalam terapi CBAVD.