

Mikrodelesi Gen *RBM* dan *DAZ* pada Pria Pasangan Infertil dalam Masyarakat yang Melakukan Kawin Kerabat

(The Microdeletion of *RBM* and *DAZ* Genes in Male Partner of Infertile Couple in Population with Inbreeding)

Hudi Winarso*, P.G. Konthen*, F.M. Judajana*

ABSTRACT

The existing phenotypic variation depends on various sites of deletion, the extent of deletion, ethnicity, geographical location, and population typology. *RBM* (RNA Binding Motive) 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 dynamic population, 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 of the study was to find out 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. The result 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

PENDAHULUAN

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 dilakukan tradisi kawin kerabat. 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 15–49 tahun) 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

20–34 th) menurun dari 0,97 pada tahun 1963 menjadi 0,51 pada tahun 1993. Jumlah penduduk tidak bertambah atau sedikit mengalami penurunan, 287 jiwa pada tahun 1964 menjadi 285 jiwa pada tahun 1974, atau 293 jiwa pada tahun 1984 menjadi 317 jiwa pada tahun 1994 dan 309 jiwa pada tahun 2004.

Laju fertilitas yang semakin menurun dari waktu ke waktu, dapat terjadi karena faktor kesengajaan atau diinginkan misalnya penggunaan kontrasepsi; tetapi dapat juga terjadi karena masalah infertilitas. Penyebab infertilitas meliputi faktor non-genetik dan atau faktor genetik. Faktor non-genetik penyebab infertilitas antara lain karena infeksi,

* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

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 mikrolelesi (**Gelehrter & Collins**, 1990).

Infertilitas merupakan kejadian yang dialami sekitar 10% pasangan suami istri, yang hampir separuhnya disebabkan karena faktor suami (Hull, 1984). Salah satu penyebab infertilitas pria karena faktor genetik yaitu mikrolelesi 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 et al.**, 2000; **Foresta et al.**, 2001; **Ferlin et al.**, 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 et al.**, 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 et al.**, 1996; **Pryor et al.**, 1997). Pewarisan tersebut dapat terjadi melalui konsepsi alami atau konsepsi dengan bantuan (*Assisted Reproductive Techniques*) (**Kent et al.**, 1996; **Page et al.**, 1999; **Cram et al.**, 2000). Bahkan delesi yang diwariskan dari seorang ayah dapat menjadi lebih luas pada anak laki-lakinya dengan manifestasi infertil atau sub fertil (**Girardi et al.**, 1997; **Simoni et al.**, 1997; **Cram et al.**, 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). Namun **Kent et al** (1999) dan **Cram** (2000) membagi region **AZF** menjadi 4 sub region yaitu **AZFa**, **AZFb**, **AZFc** dan **AZFd**. Hal ini karena di antara 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% hingga

35% (**Ferlin**, 2003). 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 et al.**, 2001).

Laporan **Hanizar** (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 et al.**, 2000) dan di Perancis (**Seifer et al.**, 1999) hanya mengalami delesi pada subregion **AZFc**, sementara itu pria pasangan infertil dengan abnormalitas yang sama di Amsterdam (**Hoffer et al.**, 1999) dan Jerman (**Maurer et al.**, 2001) tidak hanya mengalami delesi pada subregion **AZFc** tetapi juga subregion **AZFa** dan **AZFb**. Sebaliknya, pria pasangan infertil di Irlandia (**Friel et al.**, 2001) dan Swedia (**Osterlund et al.**, 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 et al.**, 1999; **Krausz and McElreavey**, 1999; **Seifer et al.**, 1999; **Tse et al.**, 2000; **Foresta et al.**, 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 et al.**, 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.

Tujuan penelitian ini yaitu untuk memisahkan mikrodal gen RBM dan DAZ pada pria infertil yang melakukan kawin dengan kerabatnya.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini menggunakan 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.

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

Kriteria sampel sebagai berikut: (1) Pria pasangan infertil adalah pria dari pasangan yang mengalami infertilitas, baik infertilitas primer maupun sekunder, (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, (3) Kawin kerabat yaitu jika antara suami dan istri terdapat kekerabatan. Kekerabatan yang dimaksud adalah jika pasangan mempunyai kakek nenek yang sama.

Variabel Penelitian terdiri dari variabel: (1) Variabel *independent*: lokasi delesi dalam subregion AZF (*STS-RBM* dan *STS-DAZ*), (2) Variabel *dependent*: kadar hormon FSH, LH dan Testosteron darah, serta infeksi *Chlamydia trachomatis* urin.

Lokasi Penelitian 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.

Prosedur Pengambilan Data yakni: (1) Penentuan Subyek, kuesioner dan pemeriksaan dengan cara menentukan subyek 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 analisa delesi gen subregion AZF. Juga dilakukan penanpungan urin untuk deteksi *Chlamydia trachomatis*. Analisa sperma dilakukan untuk pemeriksaan parameter sperma. (2) Pengukuran kadar hormon yakni dengan menggunakan Strip Reagen Vidas. (3) Deteksi *Chlamydia trachomatis* urin yakni dengan deteksi *Chlamydia trachomatis* menggunakan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). (4) Isolasi DNA dari darah perifer untuk penentuan gen RBM dan DAZ dengan cara isolasi DNA menggunakan metoda TRIZOL. (5) Visualisasi hasil PC dengan elektroforesis agarose gel 2%. (6) Sequensing hasil PCR yakni sampel DNA dijalankan dalam mesin *sequencing* ABI Prisma 310 Genetic Sequencer.

HASIL DAN DISKUSI

Gen *SRY*, *RBM*, dan *DAZ*

Identifikasi hasil penelitian gen *SRY*, *RBM* dan *DAZ* dari 20 orang pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada *Tabel 1*.

Tabel 1. Identifikasi gen *SRY*, *RBM*, dan *DAZ*

No. Subjek	SRY	RBM	DAS
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	-	-	-
5	+	+	-
6	+	+	+
7	+	-	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	-	+
11	+	-	-
12	+	-	-
13	+	-	-
14	+	-	-
15	+	-	-
16	+	-	-
17	+	-	-
17	+	-	-
19	+	-	-
20	+	+	+

Keterangan:

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

Sedangkan data prevalensi delesi gen *RBM* dan *DAZ*, ataupun subjek yang mempunyai delesi salah satu atau keduanya yaitu *RBM* atau *DAZ* saja, ataupun delesi *RBM* dan *DAZ*; tersaji pada Tabel 2.

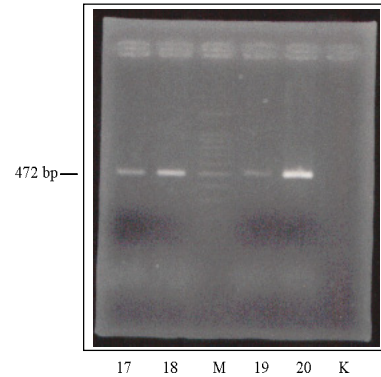
Tabel 2. Persentase delesi gen *RBM* dan *DAZ*, delesi *RBM* dan atau *DAZ*

Del RBM + DAZ	Del RBM dan atau DAZ
10 (50%)	13 (65%)

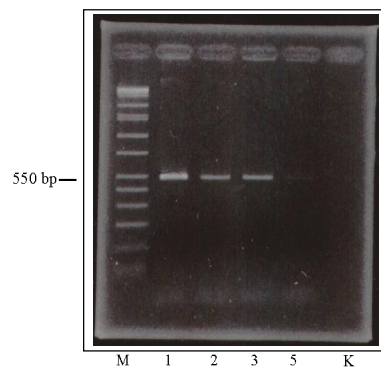
Keterangan:

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

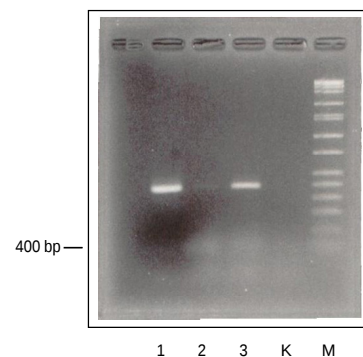
Hasil *PCR* untuk *STS-SRY* menggunakan *marker 100 bp DNA Ladder* tersaji pada Gambar 1, sedangkan hasil *PCR* untuk *STS-RBM* menggunakan *wide range DNA marker* tersaji pada Gambar 2; hasil *PCR* untuk *STS-DAZ* menggunakan *wide range DNA marker* tersaji pada Gambar 3.

**Gambar 1.** Visual hasil *PCR* untuk *STS-SRY* menggunakan *Marker 100bp DNA Ladder* (Subjek 17, 18, 19, 20).

Keterangan: M = Standard; K = Kontrol Negatif; 17, 18, 19, 20 = *SRY* Positif (Sample)

**Gambar 2.** Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-RBM* menggunakan *wide range DNA Marker* (Subjek 1, 2, 3, dan 5)

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

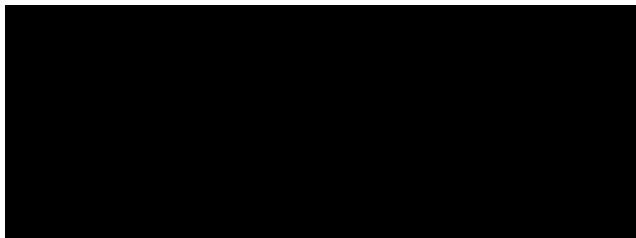
**Gambar 3.** Visualisasi hasil *PCR* untuk *STS-DAZ* menggunakan *Wide Range DNA Marker* (Subjek 1, 2, dan 3).

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

Analisis sekuen hasil *PCR STS-RBM* dan *STS-DAZ* satu subjek pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada *Gambar 4* dan *Gambar 5*.



Gambar 4. Sekuen *STS-RBM* satu subyek pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan.



Gambar 5. Sekuen *STS-DAZ* satu subyek pria pasangan infertil desa adat Tenganan Pegringsingan.

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 3*.

Uji hormon FSH, LH dan Testosteron

Hasil uji hormon FSH, LH dan Testosteron terhadap 20 pria pasangan infertil di desa adat Tenganan Pegringsingan tersaji pada *Tabel 4*.

Dinamika penduduk

Kependudukan desa adat Tenganan Pegringsingan periode 2001 sampai akhir Desember 2004 adalah sebagai berikut: Jumlah penduduk 309 jiwa (184 Laki-laki dan 125 Wanita), 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.

Tabel 3. Identifikasi Infeksi *Chlamydia* Darah (ELISA) dan *Chlamydia trachomatis* Urin (PCR)

No. Subjek	Anti Chlamydia (Elisa)	Anti Chlamydia IgM (Elisa)	Chlamydia trachomatis (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

Tabel 4. Profil Hormon LH, FSH, dan Testosteron

No. Subjek	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	Testosteron (mg/dl)
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.	30,40	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.	21,0	51,1	372,4
11.	4,40	4,3	232,3
12.	13,80	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

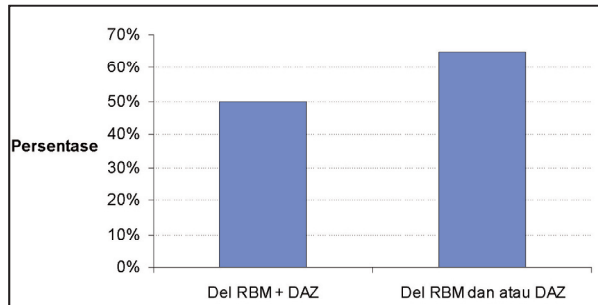
Catatan:

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

Prevalensi delesi

Subjek dengan delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ* menunjukkan prevalensi yang tinggi yaitu mencapai 50%.

Sedangkan subjek dengan delesi *STS-RBM* saja, atau delesi *STS-DAZ* saja, ataupun delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*, prevalensinya mencapai 65% (Gambar 6).

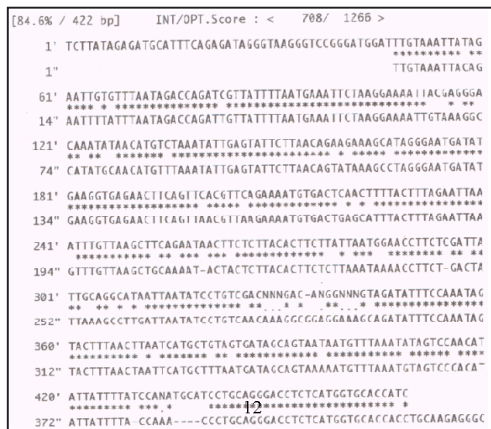


Gambar 6. Diagram prevalensi delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*, delesi *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*.

Keterangan: Del RBM + DAZ = Delesi pada *STS-RBM* + *STS-DAZ*; Del RBM dan atau DAZ = Delesi pada *STS-RBM* dan atau *STS-DAZ*

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 7).



Gambar 7. Homologi Sekuen Nukleotida satu sample *RBM* Tenganan Pegringsingan dengan *RBM* NCBI U3618.

Keterangan: ' = U36218 (*RBM* NCBI); " = *RBM* Tenganan (Sample)

Uji *Chlamydia* darah dan *Chlamydia trachomatis* urin

Hasil uji IgG dan IgM *Chlamydia* darah 20 subjek pria pasangan infertil dengan menggunakan teknik *ELISA* menunjukkan hasil 15% *Chlamydia* Anti-IgM negatif dan

Anti-IgG positif (3 di antara 20 subjek), 35% *Chlamydia* Anti-IgM positif dan anti-IgG negatif (7 di antara 20 subjek), 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).

Tabel 5. Identifikasi *Chlamydia* pada darah (ELISA)

Chlamydia	Anti Ig M Positif	Anti IgM Negatif
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.

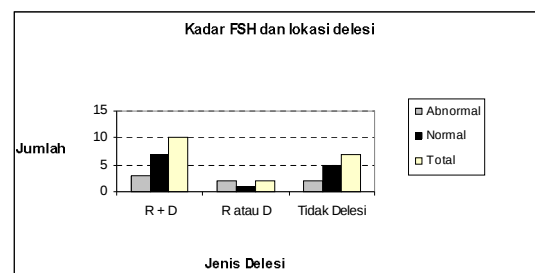
Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon FSH, LH dan Testosteron

Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon FSH tersaji pada Tabel 6 dan Gambar 8.

Tabel 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*



Gambar 8. Diagram Kadar FSH dan lokasi delesi

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

Di antara 7 subjek yang memiliki kadar *FSH* lebih tinggi dari range normal (abnormal), 71% (5 di antara 7 subjek) memiliki delesi gen *RBM* dan atau *DAZ*; sedangkan 29% (2 di antara 7) subjek tanpa delesi *RBM* dan *DAZ*. Pada 13 subjek dengan *FSH* normal, 62%

(8 di antara 13) subjek memiliki delesi *RBM* dan atau *DAZ*; 38% (5 di antara 13) subjek tanpa delesi *RBM* dan *DAZ* (Tabel 6).

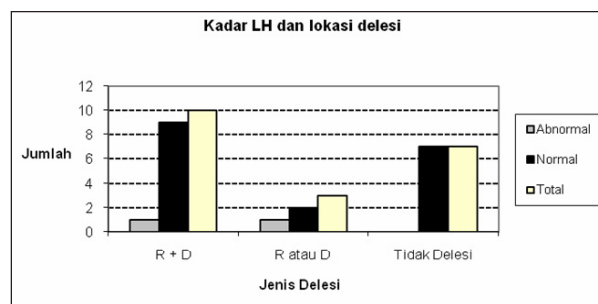
Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon *LH*

Hasil analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon *LH* tersaji pada Tabel 7 dan Gambar 9.

Tabel 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



Gambar 9. Diagram Kadar LH dan lokasi delesi
Keterangan: R + D = Delesi *STS-RBM* dan *STS-DAZ*;
R atau D = Delesi *STS-RBM* atau *STS-DAZ*

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

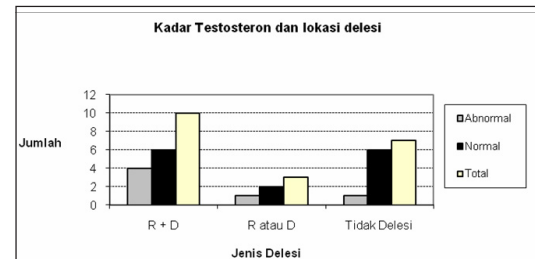
Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon Testosteron

Hasil Analisis delesi gen *RBM* dan *DAZ* terhadap kadar hormon Testosteron tersaji pada Tabel 8 dan Gambar 10.

Tabel 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



Gambar 10. Diagram Kadar Testosteron dan lokasi delesi.

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

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 subjek ekstrem-oligozoospermia didapat prevalensi 14%, sedangkan jika subjek 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, 2003). Hanizar (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 subjek, semakin selektif yaitu semakin jelek kualitas sperma subjek 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 kualitas sperma yang sub normal (**Vogt et al.**, 1996).

Tentang seberapa kuat korelasi antara delesi gen subregion *AZF* terhadap spermatogenesis, masih terdapat variasi dari beberapa peneliti yang menyatakan bahwa protein ekspresi dari *RBM* terdapat dalam spermatogonia tipe A dan B, spermatosit dan spermatid bulat (*round spermatid*). Fakta menunjukkan bahwa delesi yang sama memberi tampilan kualitas sperma yang beragam. Hal tersebut memberi indikasi bahwa proses spermatogenesis menganut sistem *polygenic* (**Hanizar E.**, 2004) atau mungkin ada *alel* pada kromosom X yang ikut berperan.

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 analisa 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 chromosome) 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.

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 et al.**, 2001). Huriez syndrome (**Vernole 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.**, 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 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.

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* 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 akan 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 14*), jumlah wanita lebih banyak dibanding laki-laki (*Gambar 15*), laju fertilitas semakin berkurang (laju fertilitas global = 0,20 dan laju fertilitas selektif = 0,47) (*Gambar 16*) dan endogami yang kawin kerabat mencapai 57% (*Gambar 17*). Dari 15 anak yang dilahirkan dalam 3 tahun terakhir, 9 anak adalah laki-laki dan 6 wanita; lebih banyaknya anak laki-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 diadvikan 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.

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 di antara 20 subjek) anti-IgG *Chlamydia* negatif dan anti-IgM *Chlamydia* negatif, 35% (7 di antara 20 subjek) anti-IgG *Chlamydia* negatif dan anti-IgM *Chlamydia* positif, 15% (3 di antara 20 subjek) anti-IgG *Chlamydia* positif dan anti-IgM *Chlamydia* negatif; sedangkan deteksi *Chlamydia trachomatis* urin dengan PCR menunjukkan hasil 100% negatif (*Tabel 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 venereum sedangkan *Chlamydia pneumoniae* dan *Chlamydia psittaci* terkait dengan pneumonia dan infeksi saluran napas.

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*.

Analisa hasil penentuan anti-IgG *Chlamydia* dan anti-IgM *Chlamydia* memberi makna bahwa 15% subjek pernah terinfeksi *Chlamydia* dan sudah mempunyai kekebalan (IgG positif dan IgM negatif), 35% subjek terinfeksi *Chlamydia* fase akut (IgG negatif dan IgM positif), sedangkan 50% subjek 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 venereum; 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 dilanjutkan 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 dalam endotel uretra.

Hormon FSH, LH, Testosteron dan delesi gen bregion AZF

Pada FSH abnormal didapatkan prevalensi delesi RBM dan DAZ pada subjek dengan FSH abnormal sebanyak 71% (5 di antara 7), sedangkan yang tanpa delesi RBM dan DAZ sebanyak 29% (2 di antara 7) (*Tabel 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.

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. 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.

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.

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

SIMPULAN DAN SARAN

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

Dari hasil kajian tentang delesi subregion AZF dalam kromosom Y pada pria pasangan infertil pada masyarakat yang melakukan kawin kerabat, diperoleh kesimpulan: 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. 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. Dari analisa pedigree 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. Perkawinan endogami di desa adat Tenganan Pegriingsingan jumlahnya semakin menurun, sedangkan perkawinan eksogami semakin meningkat.

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 Mol. Gen.* 7: 1371–1377.
- Chapelle ADL**, 1972. Nature and origin of males with XX sex chromosomes. *Am J Hum Genet* 24: 71–105.
- 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 Chromosom 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: 909–915.
- 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: 238–241.
- 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. *J. Med. Gen.* 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. *Int. J. of And.*, 24: 31–36.
- Gelehrter TD, Collins FS**, 1990. Mendelian Inheritance. In: *Principle of Medical Genetics*. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, pp: 27–45.
- Girardi SK, Mielnik A, Schelgel PN**, 1997. Submicroscopic Deletion in The Y Chromosome of Infertile Men. *Human Reprod.* 12: 1635–1641.
- Hanizar E**, 2004. Delesi region AZF (Azoospermic Factor) dalam kromosom Y Pria pasangan infertil berdasarkan etnis di Indonesia. Disertasi, Pascasarjana Universitas Airlangga.
- Hargreave TB**, 1999. Understanding the Y Chromosome. *Lancet*. Nov.20.
- Hoffer, MJV. de Vries, JWA. Redeker, B. Repping, S. Brown, L.G.-Page, D.C. Hoovers, J.M.N van der Veen, F. Leschot NJ**, 1999. Microdeletions in the Y Chromosome in Idiopathic Infertile Men. <http://www.faseb.org/genetiks/ashg99/fl254.htm>
- 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. *Mol.Reprod. Dev.* 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. *Mol. Human Reprod.* 2: 943–950.
- Krausz C and Ken McElreavey**, 1999. Y Chromosome and Male Infertility. *Frontiers in Bioscience* 4, January 15.
- 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: 27–33.
- Moro E. et al.**, 2000. Male Infertility caused by a de Novo Partial Deletion of the *DAZ* Cluster on the Y Chromosome. *J Clin. Endoc. & Metabolism*, 85: 4069–4073.
- Osterlund, Christina, Eva Segersteen, Steven Arver & Ake Pousette**, 2000. Low Number of Y-Chromosome Deletions in Infertile Azoospermic Men at A Swedish Andrology Centre. *Inter. J. Andr.* 23: 225–229.
- Page DC, 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 Reprod.* 14: 1722–1726.
- Pryor JL, Kent-First, M. Muallem, A. Van Bergen, AH. Nolten, WE. Meisner, L. Roberts, KP**,

1997. Microdeletion in The, Y Chromosome of Infertile Men. *New England J. of Med.* 336: 534–539.
- 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. *Int. J. And.* 22: 148–154.
- Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischeke A, Carani C, Meschede D, Behre HN, 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.
- 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 Med. J.* 6: 143–146.
- 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.* 83: 216–219.
- Vernole P., Terrinoni A., Didona B., De Laurensi V., Rossi P., Melino G., Grimaldi P**, 2000. An SRY-negative XX male with Hurler syndrome. *Clin Gen.* 57: 61–66.
- Vogt P.H, Edelmann 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 Mole. Gen.* 5: 933–943.