

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Tabel 2. 1 Hasil Penelitian Terdahulu

Hasil Penelitian	Referensi
Dalam studi penambatan protein-protein, diperoleh bahwa dutasterida melemahkan pengikatan energi antara ER α dan TRIM56 yang berpotensi sebagai antikanker payudara.	(Dhiani et al., 2022)
Dutasterida menyebabkan perubahan ekspresi reseptor androgen (AR) dan reseptor estrogen (ER) pada jaringan prostat jaringan. ER diketahui berekspresi di organ pria terutama di saluran reproduksi. ER memiliki dua subtipe, alfa dan beta, dan kedua subtipe ER tersebut diketahui memiliki peran penting dalam biologi saluran reproduksi pria. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi depresi jangka panjang pada tingkat androgen menyebabkan perubahan reseptor hormonal seperti penurunan reseptor gen andro dan peningkatan reseptor estrogen. Hal ini juga dilaporkan yang dihasilkan oleh agen estrogen sintetik <i>diethylstilbestrol</i> (DES), morfologi penis yang tidak normal pada tikus jantan dan perubahan morfologi ini dikaitkan dengan perubahan ekspresi ER alfa. Dianggap bahwa paparan estrogen dan aksi androgen yang lebih rendah meningkatkan regulasi ekspresi ER alpha dalam sel stroma penis dan ini dapat memprogram ulang stroma penis menjadi sel adiposit.	(Enatsu et al., 2016)
Inhibitor 5 α -Reduktase (5-ARI) seperti finasterida dan dutasterida digunakan untuk pengobatan hiperplasia prostat jinak (BPH). Secara farmakologis, dutasterida dan finasterida menghambat isozim 5-AR secara berbeda. Finasterida secara selektif menghambat isozim 5-AR tipe 2 dan menekan DHT sebesar 70% dalam serum, sedangkan dutasterida selektif menghambat tipe 1 dan tipe 2 isozim 5-AR hingga mengurangi DHT lebih dari 90%.	(Garcia-Argibay et al., 2022)
Ekspresi ESR 1 lebih tinggi pada laki-laki yang diberikan intervensi finasterida dibandingkan dengan laki-laki kontrol, tetapi serupa dengan perempuan kontrol.	(Schwartz et al., 2019)

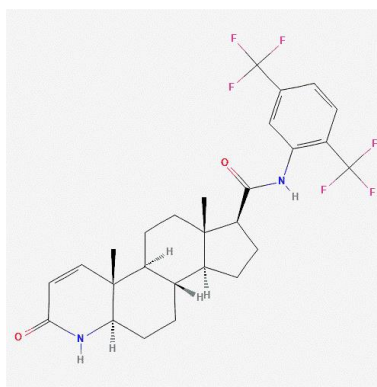
Penelitian yang dilakukan memiliki persamaan dan perbedaan dengan penelitian sebelumnya. Ekspresi yang dianalisis memiliki kesamaan, yaitu ekspresi estrogen reseptor alfa setelah diberi perlakuan dutasterida, Sedangkan perbedaan dengan penelitian sebelumnya yaitu metode penelitian ini menggunakan metode western blot dan sel yang digunakan adalah T47D dan Vero.

B. Landasan Teori

1. Dutasterida

Dutasterida adalah 5- α -reduktase inhibitor yang mencegah konversi testosteron menjadi dihidrotestosteron melalui enzim 5- α -reduktase. Dutasterida juga merupakan penghambat kompetitif enzim 5- α -reduktase yang menargetkan tipe I dan II 5- α -reduktase dan digunakan untuk mengobati hiperplasia prostat jinak (Fertig et al., 2017). Dutasterida menghambat konversi testosteron menjadi dihidrotestosteron, yang berperan penting dalam pengembangan dan pemeliharaan hiperplasia prostat. Tingkat dihidrotestosteron menurun selama terapi dutasterida, tetapi kadar testosteron serum tidak mengalami penurunan. Pada umumnya, terapi dutasterida, memerlukan waktu beberapa bulan untuk mencapai efek terapi pada ukuran prostat dan gejala hipertrofi prostat. Hal ini berbeda dengan *alpha-1 adrenergic receptor blockers (alpha blocker)* yang memiliki efek secara langsung.

Dutasterida menyebabkan perubahan ekspresi reseptor androgen (AR) dan reseptor estrogen (ER) pada jaringan prostat. ER diketahui berekspresi di organ pria terutama pada saluran reproduksi. ER memiliki dua sub tipe, alfa dan beta, dan kedua sub tipe ER tersebut diketahui memiliki peran penting dalam biologi saluran reproduksi pria. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi depresi jangka panjang pada tingkat androgen menyebabkan perubahan reseptor hormonal seperti penurunan reseptor androgen dan peningkatan reseptor estrogen. Hal ini juga dilaporkan yang dihasilkan oleh agen estrogen sintetik *diethylstilbestrol (DES)*, morfologi penis yang tidak normal pada tikus jantan dan perubahan morfologi ini dikaitkan dengan perubahan ekspresi ER alfa. Dianggap bahwa paparan estrogen dan aksi androgen yang lebih rendah meningkatkan regulasi ekspresi ER alfa dalam sel stroma penis dan ini dapat memprogram ulang stroma penis menjadi sel adiposit.



Gambar 2.1 Struktur 2 dimensi Dutasterida. (PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Dutasterida disetujui untuk digunakan di Amerika Serikat pada tahun 2001 dan tersedia dalam sediaan kapsul 0,5 mg dengan nama dagang Avodart. Dosis yang dianjurkan dari dutasterida adalah 0,5 mg sekali sehari. Dutasterida biasanya diberikan dalam jangka panjang dan efeknya biasanya tidak terlihat sampai 3 sampai 6 bulan terapi. Efek samping jarang terjadi, tetapi termasuk impotensi dan penurunan libido, ejakulasi ginekomastia, pusing dan kelelahan. Dutasterida juga menurunkan kadar serum PSA (*Prostate Specific Antigen*) yang seharusnya dipantau selama terapi.

Rumus molekuler dutasterida yaitu $C_{27}-H_{30}-F_6-N_2-O_2$. Efek pengurangan DHT oleh dutasterida bergantung pada dosis, dengan efek maksimum diamati dalam 1-2 minggu setelah pemberian awal. Setelah 1 dan 2 minggu dosis harian dengan dutasterida 0,5 mg, konsentrasi serum DHT rata-rata berkurang masing-masing sebesar 85% dan 90%. Konsentrasi serum DHT dipertahankan untuk diturunkan lebih dari 90% pada 85% pasien setelah pemberian dutasterida oral 0,5 mg/hari selama 1 tahun. Sebagai bukti dari studi klinis, dutasterida juga dapat menyebabkan penurunan serum PSA dengan adanya hiperplasia prostat jinak. Dutasterida terikat 99% pada albumin dan 96,6% terikat pada α -1 asam glikoprotein dalam serum.

Diperkirakan LD50 dermal dutasterida pada kelinci adalah >2.000 mg/kg. Terkait informasi overdosis dutasterida, telah dilakukan penelitian terhadap sukarelawan yang menerima dutasterida dosis tunggal hingga 40 mg (yaitu 80 kali dosis terapeutik) selama 7 hari, tidak ada laporan efek

samping yang signifikan secara klinis. Insiden impotensi yang rendah, penurunan libido, ginekomastia, dan gangguan ejakulasi terjadi secara signifikan lebih sering pada dutasterida daripada penerima plasebo. Tidak ada penangkal dikenal untuk dutasterida. Dalam kasus overdosis, pengobatan simptomatik dan suportif yang tepat harus diberikan.

Terkait informasi toksikologi nonklinis, dalam studi tikus karsinogenisitas selama 2 tahun, terjadi peningkatan insiden adenoma hepatoseluler jinak pada tikus betina yang menerima 250 mg/kg/hari. Peningkatan kejadian hiperplasia sel Leydig diamati pada tikus jantan yang menerima dosis 7,5 mg/kg/hari dan lebih besar. Pada dosis tumorogenik, kadar hormon luteinizing (LH) pada tikus meningkat sebesar 167%. Tidak ada potensi genotoksik yang ditunjukkan dari dutasterida atau metabolitnya dalam uji mutagenesis bakteri, uji kelainan kromosom dalam sel CHO, dan uji mikronukleus pada tikus. Pada dosis yang jauh lebih tinggi daripada dosis manusia maksimum yang direkomendasikan (MRHD; maximum recommended human dose) pada tikus jantan yang matang secara seksual, dutasterida menyebabkan penurunan kesuburan yang bergantung pada dosis dan waktu, mengurangi jumlah *sperma cauda epididymal* (absolut) tetapi bukan konsentrasi sperma (pada 50 dan 500 mg)/kg/hari), pengurangan berat epididimis, prostat, dan vesikula seminalis, dan perubahan mikroskopis pada organ reproduksi pria. Pada paparan 425- dan 315 kali lipat paparan klinis dutasterida yang diharapkan pada tikus dan anjing, masing-masing, ada beberapa tanda toksisitas non-spesifik, reversibel, yang dimediasi secara terpusat tanpa perubahan histopatologi terkait.

DHT (*Dihydrotestosterone*) adalah hormon yang diperlukan untuk perkembangan alat kelamin pria, paparan dutasterida pada wanita hamil yang mengandung janin laki-laki dapat menyebabkan kerusakan pada janin. Dalam reproduksi hewan dan studi toksisitas perkembangan, dutasterida menghambat perkembangan normal alat kelamin luar pada janin laki-laki. Meskipun tidak diketahui apakah dutasterida diekskresikan

dalam air susu manusia, penggunaan dutasterida pada wanita usia subur, termasuk wanita menyusui.

Pada pasien usia lanjut, waktu paruh dutasterida dapat meningkat. Hal ini dapat terjadi karena eliminasi dutasterida ginjal sangat minim, penggunaan dutasterida pada pasien insufisiensi ginjal dilaporkan aman. Tidak ada rekomendasi penyesuaian dosis khusus untuk digunakan pada pasien lanjut usia atau pasien dengan gangguan ginjal (National Center for Biotechnology Information, 2022).

2. Reseptor Estrogen α ($ER\alpha$)

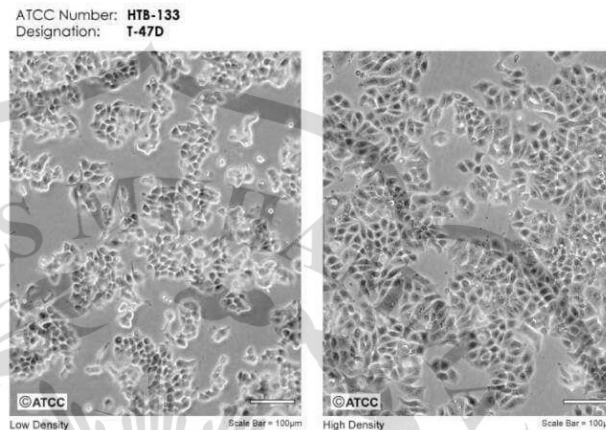
Reseptor estrogen alfa ($ER\alpha$) adalah faktor utama pertumbuhan tumor dan metastasis pada kanker payudara $ER+$, dan sering menjadi target pengobatan anti-estrogen (Matutino et al., 2018). ER bekerja sama dengan beberapa faktor transkripsi lain untuk mengontrol ekspresi gen dan pertumbuhan tumor (Siersbæk et al., 2018). $ER\alpha$ dikodekan oleh gen $ESR1$ yang berukuran 300 kb. Ekspresi gen ini dikendalikan oleh faktor transkripsi, lingkungan kromatin, faktor sekresi autokrin, parakrin, endokrin, interaksi sel, sel matriks dan gaya mekanik (Tang et al., 2019).

$ER\alpha$ tersedia pada kelenjar susu, rahim, ovarium (sel teka), tulang, alat reproduksi pria (testis dan epididimis), prostat (stroma), hati, dan jaringan adiposa. diekspresikan dalam kardiovaskular dan sentral sistem saraf peran fisiologis umum untuk dua ER , seperti pada perkembangan dan fungsi ovarium, dan dalam perlindungan kardiovaskular sistem. $ER\alpha$ memiliki peran yang lebih dominan pada kelenjar susu dan Rahim serta pada pelestarian homeostasis tulang dan pengaturan metabolisme. Pada banyak kanker payudara, aktivasi $ER\alpha$ oleh estrogen umumnya dianggap bertanggung jawab peningkatan proliferasi dengan menunjukkan ekspresi $ER\alpha$ yang tinggi. (Paterni, Iliaria. Granchi et al., 2011).

Efek estrogenik prostat adalah akibat dari pengikatan hormon dengan reseptor estrogen spesifik untuk subunit α dan β ($ER\alpha$, $ER\beta$) yang masing-masing diekspresikan secara dominan dalam stroma dan epitel. Estrogen sangat penting untuk perkembangan dan diferensiasi prostat normal, dipengaruhi tidak hanya oleh interaksi hormonal tetapi juga oleh

interaksi alternatif dan temporal. ER α memiliki peran penting dalam prostat neonatal sampai ditekan oleh efek peningkatan kadar androgen secara fisiologis, dan ketika diaktifkan secara tidak tepat, sel-sel prostat kelenjar diubah secara permanen mengakibatkan penyakit di usia lanjut dan munculnya patologi pramaligna (Alonso et al., 2017).

3. Sel Kanker Payudara T47D



Gambar 2.2 Sel T47D. (ATCC (American Type Culture Collection), 2003)

Sel T47D merupakan sel epitel hasil isolasi oleh I. Keydar dari efusi pleura yang diperoleh dari pasien wanita berusia 54 tahun dengan karsinoma duktal infiltrasi payudara. Ini adalah garis sel manusia hipotriploid. Jumlah kromosom modal adalah 65 terjadi pada 50% dan poliploidi pada 0,8%. 18 kromosom penanda umum untuk sebagian besar sel, 7 di antaranya berpasangan dan 11 salinan tunggal. T(8q14q), t(9q17q), t(10q17p) adalah di antara 7 penanda berpasangan yang umum untuk sebagian besar sel. N7, N9, dan N10 tidak ada dan N11 umumnya hadir dalam 4 eksemplar. DM terjadi, tetapi jarang. Pemeriksaan Q-band tidak menunjukkan adanya kromosom Y.

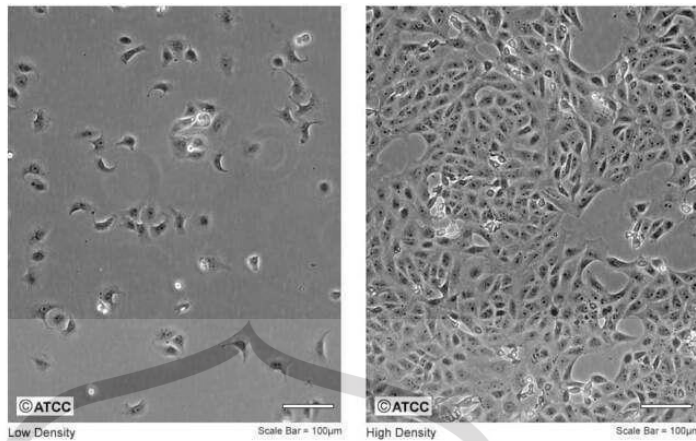
Seri Sel T47D tersedia dari pabrik dalam bentuk beku dan disimpan pada kondisi fase uap nitrogen cair. Produk ini ditujukan hanya untuk penelitian laboratorium, tidak dimaksudkan untuk penggunaan terapeutik hewan atau manusia, tidak digunakan sebagai sumber makanan manusia atau hewan, dan tidak ditujukan untuk penggunaan diagnostik apa pun.

4. Sel Vero

Sel Vero yang digunakan untuk percobaan perbanyak sel awalnya diperoleh dari American Type Culture Collection (ATCC; CCL-81; Manassas, VA). Sel Vero secara rutin dikultur dalam labu (Corning, Corning, NY) pada suhu 37°C/5% CO₂ dalam inkubator yang dilembapkan dan dilewatkan setiap 3-5 hari. Evaluasi produksi virus Dengue dan Zika (DENV dan ZIKV) dilakukan dengan menggunakan sel Vero yang awalnya diperoleh dari Sigma-Aldrich (St Louis, MO) dan dipelihara di Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit (CDC). Garis sel Vero-VP30 yang secara stabil mengekspresikan gen VP30 dari Zaire ebolavirus dibuat seperti yang dijelaskan sebelumnya untuk amplifikasi virus EbolaΔVP30 yang terkandung secara biologis, dan bank sel yang berfungsi dari garis sel ini kemudian dibuat oleh Biomanufaktur Waisman (Alfano et al., 2020).

Cell line Vero dimulai pada tahun 1962 dari jaringan ginjal yang berasal dari monyet hijau Afrika dewasa yang normal. *Cell line* dapat digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk deteksi verotoksin, deteksi virus dalam daging giling, pengujian efikasi, studi malaria, pengujian media, dan pengujian mikoplasma. Ini adalah garis sel dengan jumlah kromosom hipodiploid. Jumlah kromosom modal adalah 58 yang terjadi pada 66% sel. Di sebagian besar sel, lebih dari 50% kromosom di setiap pelengkap sel milik kromosom penanda yang diubah secara struktural. A3, A4, B4, dan B5 normal tidak ada; B2, B3 dan B7 terkadang dipasangkan; dan B9, C1 dan C5 sebagian besar dipasangkan. Tingkat sel dengan ploidi yang lebih tinggi adalah 1,7%. Garis sel dibawa ke Laboratorium Virologi Tropis, Institut Nasional Alergi dan Penyakit Menular, Institut Kesehatan Nasional di bagian ke-93 dari Universitas Chiba oleh B. Simizu pada 15 Juni 1964. Kromosom lain sebagian besar hadir dalam salinan tunggal. Garis sel Vero dimulai dari ginjal monyet hijau Afrika dewasa normal pada 27 Maret 1962, oleh Y. Yasumura dan Y. Kawakita di Universitas Chiba di Chiba, Jepang (ATCC, 1962).

ATCC Number: **CCL-81**
Designation: **Vero**



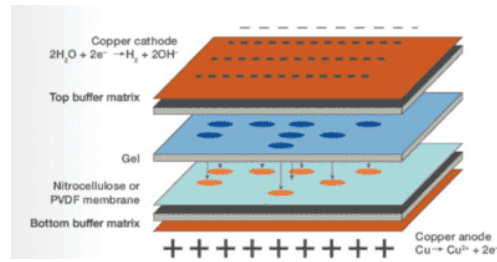
Gambar 2.3 sel Vero. (ATCC, 1962)

Produk ini ditujukan hanya untuk penelitian laboratorium. Ini tidak dimaksudkan untuk penggunaan terapeutik hewan atau manusia, konsumsi manusia atau hewan, atau penggunaan diagnostik apa pun.

5. Bradford Assay

Bradford *assay* merupakan metode cepat dan cukup sensitif untuk mengukur konsentrasi protein. Hal ini didasarkan pada prinsip bradford *assay*, yaitu pengikatan molekul protein pada pewarna coomassie brilliant blue. Pengikatan *coomassie brilliant blue* dengan protein terdenaturasi mengakibatkan pergeseran spektrum serapan pewarna dari 465 nm menjadi 595 nm, sehingga terjadi perubahan warna dari coklat menjadi biru. Metode ini sebenarnya mengukur keberadaan residu asam amino basa, arginin, lisin, dan histidine yang berkontribusi terhadap pembentukan kompleks protein-pewarna (Kielkopf et al., 2020). BSA digunakan sebagai standar untuk Bradford *assay*. Kurva kalibrasi berdasarkan konsentrasi massa BSA digunakan untuk menentukan konsentrasi protein yang tidak diketahui (Pamlea et al., 2016).

6. Western Blot



Gambar 2.4 Skema transfer protein metode western blot. (ThermoFisher Scientific, 2021)

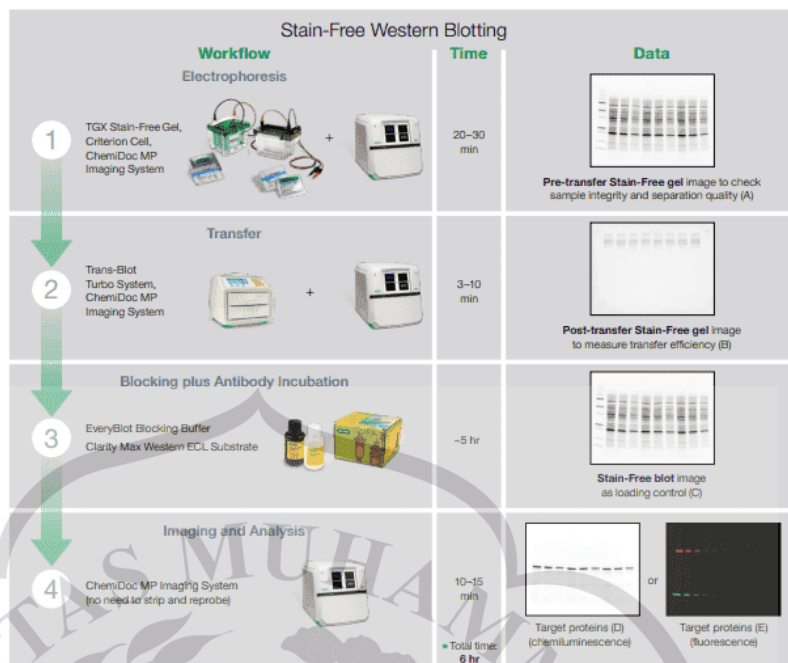
Western blot adalah metode yang digunakan untuk mendeteksi protein. *Western blotting* (juga dikenal sebagai protein immunoblot) adalah metode standar emas untuk mengidentifikasi dan mengukur protein spesifik dalam campuran kompleks yang diekstrak dari sel atau jaringan lisat.

Analisis dengan menggunakan metode *western blot chemiluminescent* adalah alternatif yang sangat sensitif untuk mendeteksi ekspresi protein. Beberapa antibodi yang terkonjugasi dengan enzim digunakan untuk mengubah substrat menjadi substrat yang menghasilkan sinyal cahaya. Sinyal dapat ditangkap pada film atau dengan peralatan pencitraan khusus, sehingga dapat menampilkan pita protein dengan intensitas (ukuran dan tebal) protein yang diteliti. Western blot adalah teknik biologi molekuler yang berpusat pada pemisahan dan deteksi protein berdasarkan ukuran. Western blot terdiri dari elektroforesis gel *sodium dodesilsulfat-poliakrilamida* (SDS-PAGE) diikuti oleh transfer protein ke membran nitroselulosa atau *polivinilidena difluorida* (PVDF) dan deteksi protein selanjutnya dengan antibodi primer dan sekunder (Giaever et al., 2018).

Western blot terdiri dari elektroforesis gel SDS-PAGE diikuti oleh transfer protein ke membran nitroselulosa atau *polivinilidena difluorida* (PVDF) dan deteksi protein selanjutnya dengan antibodi primer dan sekunder. Dalam kedua teknik tersebut, komponen yang dipisahkan secara elektroforesis dipindahkan dari gel ke pendukung padat dan diperiksa dengan reagen yang spesifik untuk rangkaian asam amino tertentu. Dalam penggunaan protein, *probe* biasanya adalah antibodi yang bereaksi secara

khusus dengan epitop antigenik yang ditampilkan oleh protein target yang melekat pada penyangga padat. Oleh karena itu *western blotting* sangat berguna untuk identifikasi dan kuantisasi protein spesifik. Selanjutnya, karena pemisahan elektroforesis protein hampir selalu dilakukan di bawah kondisi denaturasi, maka masalah solubilisasi, agregasi, dan kopresipitasi protein target dengan protein adventif dihilangkan. Data western blot yang andal hanya dapat dihasilkan jika jumlah sampel protein yang tepat digunakan. Memuat terlalu banyak protein menyebabkan kejenuhan sinyal di western blot, namun terlalu sedikit menghasilkan sinyal yang lemah (Estimation et al., 1981).

Pada western blotting, sampel yang akan diuji dilarutkan dengan deterjen dan zat pereduksi, dipisahkan dengan elektroforesis gel SDS-PAGE dan dipindahkan ke pendukung padat (biasanya filter nitroselulosa atau PVDF), yang kemudian dapat diwarnai (misalnya, dengan Ponceau S). Filter kemudian diekspos ke antibodi yang tidak berlabel spesifik untuk protein target. Akhirnya, antibodi yang terikat dideteksi oleh salah satu dari beberapa reagen imunologi sekunder (misalnya, anti-imunoglobulin, atau protein A digabungkan ke *rabbit-radish peroksidase* atau *alkaline phosphatase*), diikuti oleh autoradiografi, peningkatan *chemiluminescence*, atau produksi enzimatik dari endapan berwarna. Sedikitnya 1-5 ng protein berukuran rata-rata dapat dideteksi dengan western blotting (Sambrook, Joseph; Russell, 2001). Western blot memungkinkan analisis menjadi lebih cepat, kuantitatif, dan lebih transparan serta andal dalam mendeteksi protein.



Gambar 2.5 Workflow of western blot. (Glaever *et al.*, 2018)

Alur kerja *western blotting stain free* digambarkan di kolom kiri dalam empat langkah. Instrumen dan reagen utama yang digunakan dalam alur kerja ditampilkan di setiap langkah. Perkiraan waktu untuk setiap langkah juga diinduksi. Saat melakukan *western blotting stain free*, *stripping* dan *reprobing blot* untuk *housekeeping* protein tidak diperlukan. *Western blotting stain free* adalah kontrol pemuatan yang cocok.

Kolom kanan menunjukkan bahwa minimal empat gambar dapat dihasilkan dalam alur kerja *western blotting stain free*. Penggunaan masing-masing bagian data dijelaskan. Gambar *stain free* dari gel pra-transfer, gel pasca transfer, dan blot (A, B, C) tidak dapat dihasilkan dengan cara yang nyaman dan andal jika menggunakan pendekatan tradisional, tetapi gambar tersebut memberikan informasi penting dan pos pemeriksaan di sepanjang cara yang meningkatkan kontrol dan reproduktifitas alur kerja *western blot*.

Sinyal protein target dapat ditangkap baik pada gambar *chemiluminescent blot* (D), jika antibodi sekunder terkonjugasi HPP diterapkan dalam deteksi, atau pada gambar bercak fluoresen (E), jika multiplexing fluorescent western blotting dilakukan, untuk mendeteksi lebih dari satu protein target secara bersamaan pada bercak yang sama (E).

Gambar A, B, C dan E dihasilkan dalam eksperimen *western blotting* fluoresen multipleks. Dalam percobaan ini, BCL 2 diperiksa dalam seri 2x *dilution* lisat sel jurkat menggunakan antibodi *mose* dan antibodi anti-tikus kambing terkonjugasi DyLight 800. Protein UBA1 diperiksa menggunakan antibodi kelinci dan antibodi anti-kelinci domba terkonjugasi DyLight 680. Gel persentase tinggi sengaja digunakan dalam percobaan ini untuk menunjukkan bahwa beberapa protein besar tetap berada di gel setelah transfer (B). Gel gradien (misalnya, 4-15%) harus digunakan untuk efisiensi transfer yang lebih baik jika ukuran protein target lebih dari 100kD (Glaever et al., 2018).

C. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah dutasterida memberikan pengaruh terhadap level ekspresi ER α pada sel kanker payudara.