

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian Estrogen Reseptor

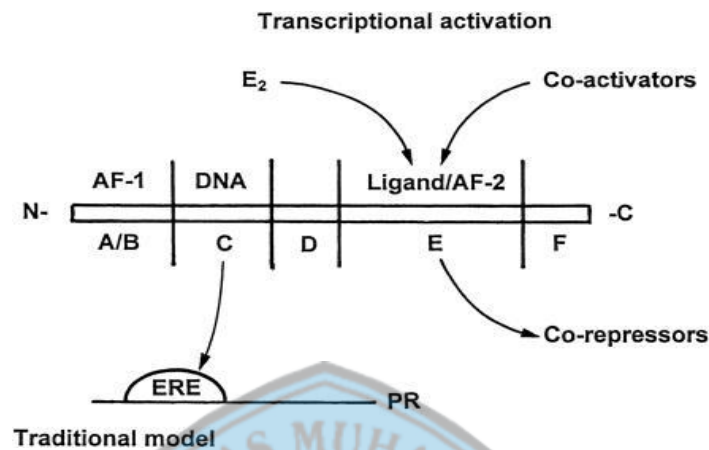
Estrogen reseptor (ER) merupakan salah satu anggota reseptor inti yang memperantarai aksi hormon estrogen didalam tubuh (Prawiroharsono, 2001 dalam Mulyati, 2016). Estrogen memiliki peranan penting dalam perkembangan, diferensiasi dan pada sistem reproduksi (Berry, 2008). Estrogen akan masuk ke dalam sel, tetapi hanya sel yang mengandung reseptor estrogen yang akan merespon. Estrogen di dalam tubuh terdapat dua reseptor yang dikenal yaitu estrogen reseptor alfa ($ER\alpha$) dan estrogen reseptor beta ($ER\beta$) (Beshay, 2013). Kedua reseptor tersebut secara luas ditampilkan dalam jenis jaringan yang berbeda, terdapat beberapa perbedaan dalam pola ekspresinya. $ER\alpha$ bisa didapatkan pada sel kanker endometrium, payudara, stroma ovarium, dan hipotalamus. Protein $ER\beta$ ekspresinya terdapat dalam ginjal, otak, tulang, jantung, paru-paru, mukosa usus, prostat, dan sel endotel. Jika suatu reseptor berikatan dengan estrogen, maka akan terjadi perubahan formasi reseptor yang memungkinkan terjadinya ikatan koaktivator dan mengaktifkan faktor transkripsi. Aktivasi transkripsi gen akan mengarahkan sintesis protein tertentu yang kemudian mempengaruhi berbagai fungsi sel tergantung macamnya dan tergetnya. Salah satu titik tangkap pengobatan kanker khususnya kanker payudara adalah dengan menghambat aktivitas estrogen pada estrogen reseptor alfa ($ER\alpha$). Pada kasus kanker payudara, $ER\alpha$ berikatan dengan estrogen dan berpoliferasi secara abnormal (Putra *et al*, 2008).

2.1.1 Struktur Estrogen Reseptor

ER α dan ER β adalah anggota *superfamili steroid / nuklir reseptor* (NR) yang mencakup lebih dari 150 anggota. Anggota ini memiliki struktur dan mekanisme umum yang mempengaruhi transkripsi banyak gen target dalam mengkode sinyal fisiologis dan patologis spesifik. NR superfamili meliputi NR kelas I, reseptor steroid: glukokortikoid, mineralokortikoid, progesteron, estrogen, dan androgen (GR, MR, PR, ER, dan AR), dan NR kelas II: reseptor asam retinoat, reseptor retinoid X, vitamin D reseptor, reseptor tiroid, dan peroxisome proliferasi aktivasi reseptor (RAR, RXR, VDR, TR, dan PPAR). ER α pertama kali dikloning dari sel kanker payudara manusia pada tahun 1986, sementara ER β ditemukan 10 tahun kemudian. Kedua sub tipe reseptor ini bervariasi dalam struktur, dan gen pengkodeannya berbeda pada kromosomnya (Berry, 2008). ER terdiri dari 6 domain (bagian) fungsional yaitu :

1. Domain A/B, merupakan bagian yang aktivasinya tidak tergantung ligan atau disebut bagian transaktivasi fungsi 1 (AF 1).
2. Domain C, merupakan tempat berikatan dengan DNA (DNA binding domain). Daerah ini memiliki kesamaan asam amino sebesar 99 % pada kedua ER.
3. Domain D, merupakan bagian terdapatnya sinyal dengan nukleus dan berhubungan dengan domain C.
4. Domain EF adalah bagian terminal yang merupakan bagian yang berikatan dengan ligan, terjadinya dimerisasi atau proses penggabungan dua molekul sejenis menjadi satu molekul yang lebih besar dan fungsi transaktivasi yang

tergantung ligan (AF2). Bagian ini memiliki kesamaan asam amino sebesar lebih kurang 58 % (Nilson et al., 2001 “dalam” Mahmudati, 2015).



Gambar 1. Struktur Estrogen Reseptor (Levin, 2001 “dalam” Mahmudati, 2015)

2.1.2 Imunohistokimia (IHC)

Imunohistokimia merupakan sebuah teknik yang bertujuan untuk mengidentifikasi sel-sel spesifik berdasarkan komponen antigenik atau produk selulernya dengan reaksi kompleks antigen-antibodi. Dengan kata lain imunohistokimia, digunakan sebagai dasar penegakan diagnosis dan identifikasi tipe sel berdasarkan detail morfologi, terutama sering digunakan pada kasus-kasus tumor dan keganasan kanker (Rahayu, 2004).

2.1.3 Tahap dasar IHC

Prosedur umum pengecatan IHC terdiri dari beberapa langkah tahapan dasar, yaitu:

a. Fiksasi dan Processing Jaringan

Pada pengecatan IHC, cairan fiksasi yang umum digunakan adalah buffer formalin 10% dalam suasana netral selama 24-72 jam. Processing jaringan itu sendiri terdiri dari fiksasi, dehidrasi, dan embedding (penanaman) jaringan pada blok parafin agar jaringan menjadi kaku (Dabbs, 2013).

b. Endogenous Blocking

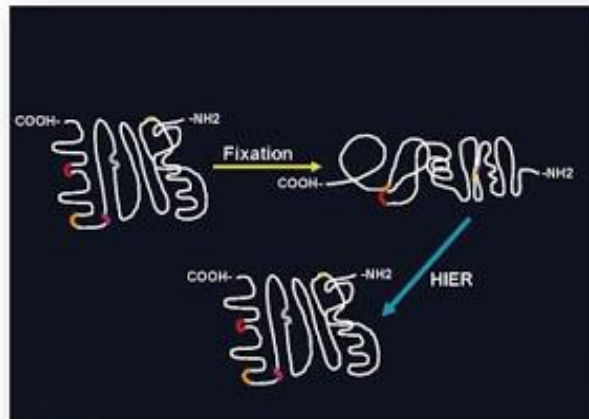
Proses *endogenous blocking* merupakan sesuatu yang sangat penting dalam proses pengecatan IHC. Tingkat kerentanan enzim dalam mengalami denaturasi dan inaktivasi selama proses fiksasi sangat bervariasi. Positif palsu juga dapat terjadi akibat adanya *endogenous peroxidase* dimana peroxidase pada jaringan dapat bereaksi dengan H₂O₂ yang diberikan bersama DAB menimbulkan warna coklat pada sel yang mengandung *endogenous peroxidase* (Irawan, 2015).

c. Antigen Retrieval

Antigen retrieval merupakan salah satu langkah dari pewarnaan imunohistokimia. Teknik sederhana antigen retrieval telah berperan penting dalam memperluas pewarnaan imunohistokimia (Vinod *et al*, 2016). Proses antigen retrieval bertujuan untuk memunculkan kembali epitop dengan mengembalikan struktur protein atau antigen yang tertutup pada saat proses fiksasi (Dabbs, 2013).

Terdapat beberapa metode antigen retrieval menurut (Ramos-Vara, 2005) Pertama dengan menggunakan metode enzimatik/*Protease-induced epitope retrieval*. *Protease-induced epitope retrieval* merupakan metode dengan menggunakan enzim. Enzim yang digunakan antara lain : tripsin, proteinase K, pronase, ficin, dan pepsin. Kelemahan dari metode *Protease-induced epitope retrieval* yaitu bila jumlah antigen yang rendah akan memungkinkan perubahan jaringan morfologi dan memungkinkan kerusakan pada epitop.

Kedua dengan menggunakan metode pemanasan/*Heat induced epitope retrieval*. *Heat induced epitope retrieval* merupakan metode yang dipanaskan dengan menggunakan microwave, pressure cooker, waterbath, dan autoclave dengan menggunakan buffer penyangga. *Heat induced epitope retrieval* memiliki efek yang baik untuk membantu membuka *mask* pada epitope (dalam hal mendeteksi antigen) pada preparat yang difiksasi dengan formaldehyde (cross-linking fixative). Namun penggunaan *Heat induced epitope retrieval* memiliki kelemahan yaitu dapat meningkatkan ekspresi endogenous biotin pada organ tertentu yang mengandung banyak mitokondria seperti sel hepar, ginjal, glandula mammae, jaringan adiposa dan limpa, sehingga menimbulkan efek positif palsu. Namun kelemahan ini hanya muncul pada prosedur tertentu yang lama dan tingkat suhu pada organ tertentu. Jadi tidak semua organ yang diwarnai IHC dengan prosedur HIER akan menyebabkan timbulnya positif palsu.



Gambar 2. Gambaran HIER: *Heat induced epitope retrieval* (Ramos-Vara, 2005)

d. Protein Blocking

Protein blocking diterapkan sebelum menggunakan antibodi untuk mendeteksi antigen spesifik dalam jaringan pada pengecatan IHC. Prinsip dari proses protein blocking menurut Latja (2007) adalah larutan protein (blocking agent) yang ditambahkan akan mengikat protein nonspesifik yang terdapat dalam jaringan sehingga membatasinya untuk berikatan dengan antibodi. Cara yang paling efektif untuk meminimalisasi pewarnaan nonspesifik adalah dengan menambahkan larutan protein (Bancroft dan Gamble, 2008). Beberapa blocking agent untuk protein blocking menurut Radig (2013), yaitu: Normal Serum, Protein Solution, Commercial Mixes.

e. Inkubasi Antibodi

Antibodi merupakan suatu molekul yang dapat berikatan dengan molekul kedua, yang disebut dengan antigen. Antibodi ini nantinya akan berikatan secara spesifik dengan antigen atau protein yang terdapat dalam jaringan. Antibodi yang

digunakan dalam pengecatan IHC dihasilkan dari hewan yang diinduksi secara khusus dengan antigen tertentu untuk memunculkan respon imun. Antibodi yang digunakan untuk menginkubasi dapat menggunakan antibodi monoklonal maupun poliklonal (Dabbs, 2013).

2.1.4 Metode Pengecatan Imunohistokimia

Metode atau sistem deteksi dalam pengecatan IHC yang dapat digunakan untuk melokalisasi dan menampilkan antigen dalam jaringan (Bancroft dan Gamble, 2008) yaitu:

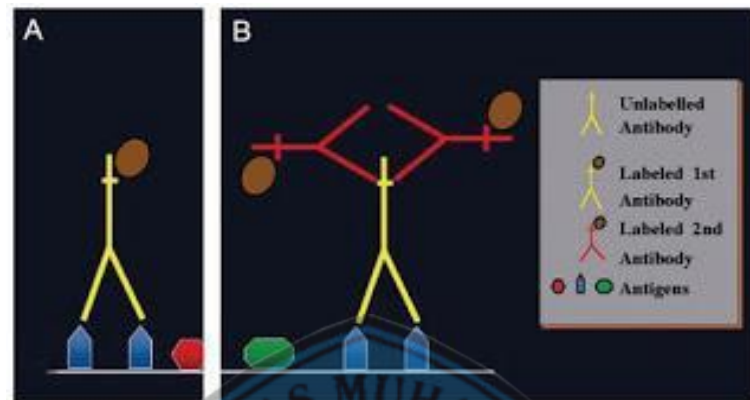
a. Metode langsung (Direct)

Metode yang hanya menggunakan satu jenis antibodi yang berikatan secara kovalen pada antibodi primer (bioscience, 2010). Antibodi primer yang telah berlabel akan bereaksi langsung dengan antigen pada preparat sitologi maupun histologi untuk mengenali antigen spesifiknya yang terdapat pada sel jaringan (Bancroft dan Gamble, 2008). Kelemahan metode direct adalah amplifikasi sinyal atau pewarnaan kurang memadai dan kurang sensitif untuk permintaan diagnosa (Irawan, 2015).

b. Metode tidak langsung (Indirect)

Metode indirect lebih rumit dan lama pengerjaannya apabila dibandingkan dengan metode direct yang digunakan dalam pengecatan IHC (Howard dan Kaser, 2014). Metode indirect labelling akan melekat secara kovalen pada antibodi sekunder, dimana antibodi sekunder akan melekat dengan antibodi primer saat proses immunoassay (Innova bioscience, 2010). Kelebihan dari metode indirect

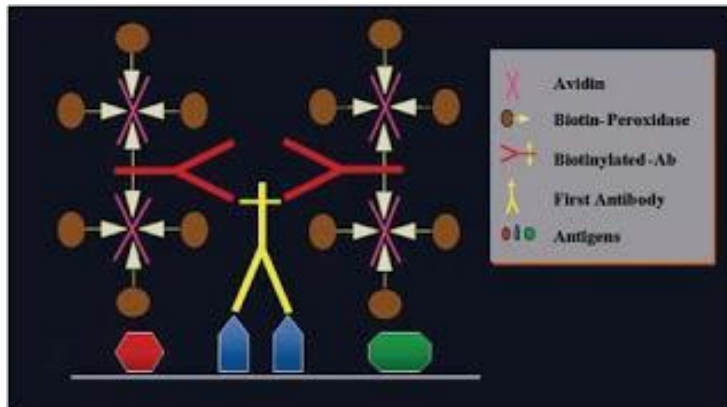
adalah memiliki tingkat sensitivitas yang lebih tinggi yaitu beberapa ribu kali lebih sensitif dari pada metode direct sehingga metode indirect saat ini lebih banyak digunakan dalam pemeriksaan IHC (Howard dan Kaser, 2014).



Gambar 3. Gambaran direct labelling (A) dan indirect labelling (B) (Ramos-Vara,2005)

c. Metode Avidin-Biotin Complex (ABC)

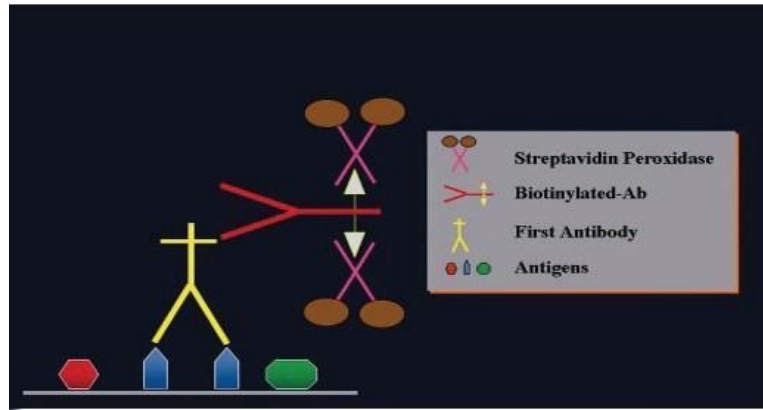
Metode Avidin Biotin Complex (ABC) menggunakan enzim peroxidase yang berikatan dengan ikatan biotin-avidin. Avidin tersebut akan berikatan dengan biotin pada antibodi sekunder. Peroxidase pada ikatan ABC akan bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama kromogen sehingga menimbulkan visualisasi warna pada sel yang mengandung antigen, dimana proses awal terjadinya antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang berlabel biotin, biotin yang berada pada antibodi sekunder akan diikat oleh ABC yang mengandung peroxidase, dan peroxidase pada rangkaian avidin biotin akan bereaksi dengan substrate H_2O_2 / kromogen (Petersen dan Pedersen, 2016).



Gambar 4. Gambaran metode Avidin Biotin Complex (ABC) (Ramos-Vara, 2005)

d. Metode Streptavidin-Peroxidase

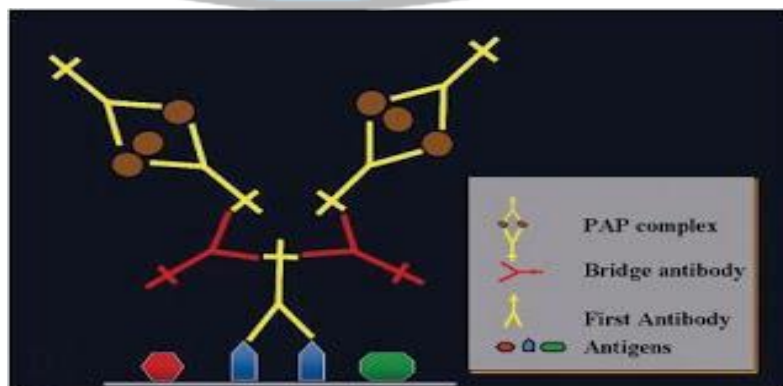
Metode streptavidin-peroxidase menggunakan enzim peroxidase yang berikatan langsung dengan streptavidin. Streptavidin yang mengandung peroxidase akan mengenali biotin pada antibodi sekunder. Peroxidase yang pada ikatan streptavidin akan bereaksi dengan H_2O_2 yang diberikan bersama kromogen sehingga menimbulkan visualisasi warna pada sel yang mengandung antigen, dimana proses awal terjadi ketika antigen berikatan dengan antibodi primer, kemudian antibodi sekunder yang berlabel akan berikatan dengan antibodi primer, biotin pada antibodi sekunder diikat oleh streptavidin yang mengandung peroxidase, dan peroxidase akan bereaksi dengan substrate H_2O_2 / kromogen (Petersen dan Pedersen, 2016).



Gambar 5. Gambaran Metode Streptavidin-Peroxidase (Ramos-Vara, 2005)

e. Metode Peroxidase-antiperoxida (PAP)

Metode peroxidase-antiperoxidase (PAP) menggunakan enzim peroxidase yang berikatan dengan antibodi, dimana antibodi primer dan PAP yang digunakan berasal dari spesies yang sama, misalkan antibodi primer yang digunakan adalah mouse monoclonal maka PAP juga harus dalam mouse, begitu juga bila antibodi primer spesies rabbit, maka antibodi pada PAP juga dalam rabbit. Metode ini menggunakan antibodi sekunder yang tidak terkonjugasi, dimana spesies antibodi sekunder merupakan anti-antibodi primer yaitu bila antibodi primer adalah mouse maka antibodi sekunder adalah anti mouse, begitu juga bila antibody primer adalah rabbit maka antibodi sekunder adalah anti rabbit (Ramos-Vara, 2005).



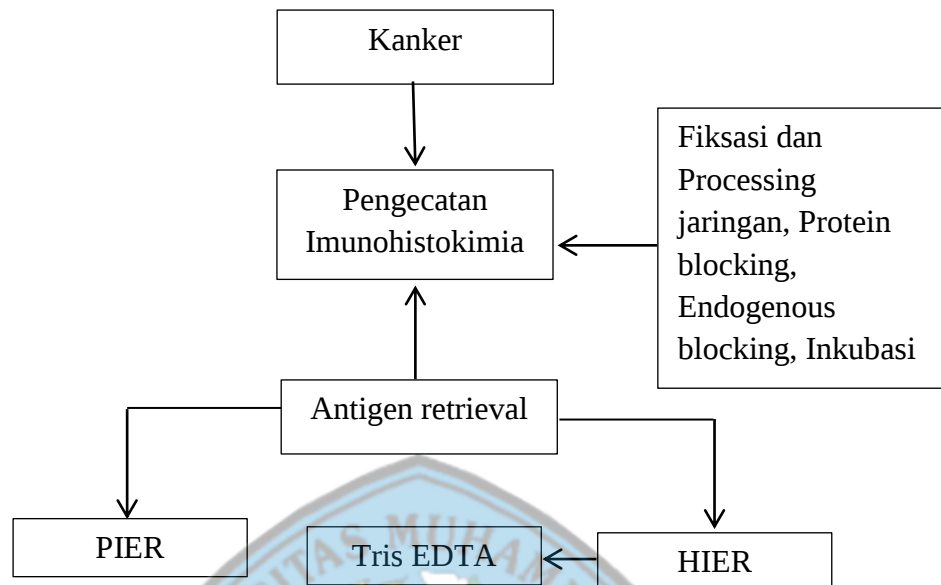
Gambar 6. Gambaran metode Peroxidase-antiperoxidase (PAP) (Ramos-Vara, 2005)

2.2 Pengertian Tris EDTA

Buffer Tris EDTA adalah campuran antara larutan Tris-HCl dengan EDTA pada konsentrasi tertentu. Tris EDTA dalam praktikum biologi molekuler berfungsi untuk menstabilkan DNA dan RNA karena pH nya 8. Karena DNA dan RNA memiliki sifat asam lemah, yang dalam waktu lama dapat menyebabkan degradasi DNA/RNA, sehingga dibuatlah Buffer Tris EDTA tersebut (Fatmawati, 2015). Pembuatan reagen TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) bahan-bahan yang dibutuhkan yaitu : Tris-HCl 1,576 gram, EDTA 0,2922 gram, Akuades 1 liter. Cara pembuatan : Tris-HCl dilarutkan kedalam 800 ml akuades kemudian dihomogenkan, EDTA ditambahkan ke dalam larutan. Akuades ditambahkan hingga volume larutan 1 liter. Tambahkan jumlah microliter HCl molaritas tinggi untuk menurunkan pH menjadi asam dan tambahkan jumlah microliter NaOH molaritas tinggi untuk menaikkan pH menjadi basa. Larutan TE 1X disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit.

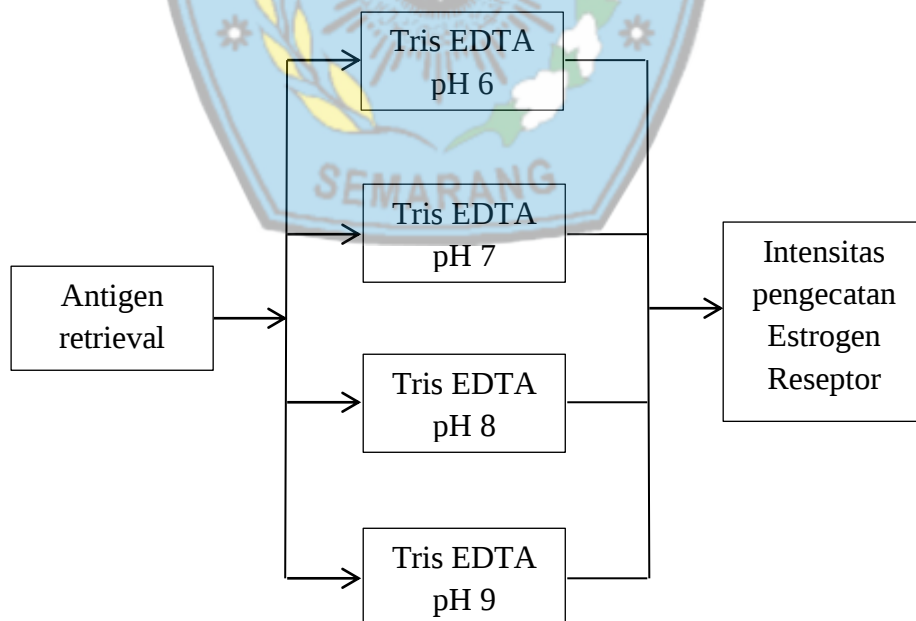
Tris EDTA digunakan sebagai antigen retrieval yang bertujuan untuk memperbaiki pewarnaan imunohistokimia bertujuan untuk memunculkan kembali epitop dengan mengembalikan struktur protein atau antigen yang tertutup pada saat proses fiksasi (Ramos-Vara, 2005).

2.3 Kerangka Teori



Gambar 7. Kerangka Teori Penelitian

2.4 Kerangka Konsep



Gambar 8. Kerangka Konsep Penelitian

2.5 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini yaitu terdapat perbedaan gambaran pewarnaan ER yang dihasilkan dari pengecatan IHC dengan Tris EDTA pH 6, pH 7, pH 8, dan pH 9 dengan buffer sitrat. Tris EDTA dapat menggantikan buffer sitrat.

