



UNIVERSITAS INDONESIA

VARIASI FENOTIP SEX HORMONE BINDING GLOBULIN(SHBG)
PADA PRIA INDONESIA DEWASA SEHAT SERTA KEMUNGKINAN
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR SHBG

TESIS

MAGISTER

PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK

OLEH :

SINTA DEVIYANTI

NPM : 8197010188

PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS INDONESIA
BIDANG ILMU KESEHATAN – PROGRAM STUDI ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BIOLOGI KEDOKTERAN
JAKARTA 2002

**VARIASI FENOTIP SEX HORMONE BINDING GLOBULIN (SHBG)
PADA PRIA INDONESIA DEWASA SEHAT SERTA KEMUNGKINAN
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR SHBG**

OLEH :

**SINTA DEVIYANTI
NPM : 8197010188**

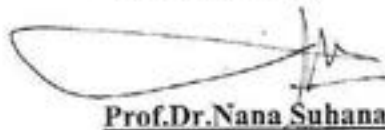
TESIS

**UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN MEMPEROLEH GELAR
MAGISTER ILMU BIOMEDIK (M.BIOMED)
KEKHUSUSAN BIOLOGI**

**PADA
PROGRAM PASCA SARJANA UNIVERSITAS INDONESIA
JAKARTA 2002**

VARIASI FENOTIP SEX HORMONE BINDING GLOBULIN (SHBG)
PADA PRIA INDONESIA DEWASA SEHAT SERTA KEMUNGKINAN
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR SHBG

Telah disetujui :



Prof. Dr. Nana Suhana

Pembimbing I



Indra Gusti Mansur, dr., DHES., SpAnd

Pembimbing II



Alida R. Harahap, dr., SpPk., PhD.

Pembimbing III



Mohamad Sadikin, dr., DSc.

Ketua Program Studi Ilmu Biomedik



Prof. Husein Alatas, dr., SpA(K)

Pembantu Dekan V FKUI



Prof. Ali Sulaiman, dr., SpPD., PhD.

Dekan FKUI

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan NYA dalam penelitian dan penyelesaian tesis ini. Adapun tujuan penelitian yang dituangkan dalam penulisan tesis guna memenuhi persyaratan memperoleh gelar Magister Biomedik ini adalah untuk memeriksa variasi fenotip *SHBG* pada pria Indonesia dewasa sehat serta kemungkinan pengaruhnya terhadap kadar *SHBG*.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. N. Suhana sebagai pembimbing pertama, atas segala kesabaran, petunjuk dan saran-saran yang telah diberikan sejak awal penelitian hingga selesainya penyusunan tesis ini. Penghargaan dan ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada dr. Indra G. Mansur, DHES., SpAnd selaku pembimbing kedua dan terutama kepada dr. Alida R. Harahap, SpPk., PhD selaku pembimbing ketiga yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing dan memberikan pengarahan serta kritik yang sangat berharga hingga selesainya penyusunan tesis ini. Juga kepada Ibu Rosila Idris, MS sebagai salah satu pembimbing untuk tim peneliti *SHBG* lainnya, saya ucapkan terima kasih atas perhatian yang telah diberikan dalam penelitian ini.

Ucapan terima kasih saya sampaikan pula kepada Prof.Dr.Nukman Moelock, dr., SpAnd selaku Kepala Bagian Biologi Kedokteran FKUI (Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia), serta kepada Prof.Dr. Oentoeng Soeradi selaku mantan Kepala Bagian Biologi Kedokteran FKUI, atas segala dorongan dan petunjuk yang berharga selama saya menjalani kuliah. Kepada Prof. Dr. J. Freisleben, selaku konsultan dalam penelitian *SHBG* ini, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang mendalam atas bimbingannya selama melakukan penelitian hingga selesainya penelitian ini.

Terima kasih saya sampaikan kepada Drs. Purnomo Soeharso, PhD, selaku Ketua Kekhususan Biologi Kedokteran FKUI yang telah banyak memberikan bimbingan selama menjalani kuliah serta bersedia meminjamkan ruangan laboratorium biologi molekular, sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Juga kepada seluruh staf pengajar di Bagian Biologi Kedokteran FKUI serta semua teman dan sahabat terutama Bernard,Edi,Yayuk,Nur,Vivit, dan Dyah sebagai anggota tim peneliti *SHBG* saya ucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya atas segala perhatian, bantuan dan kebersamaannya selama ini.

Penulis juga ingin menyampaikan terima kasih kepada Dr.Enud J.Surjana, SpOG selaku Kepala Laboratorium Makmal Terpadu FKUI Jakarta dan kepada Dr.Nur Asikin,PhD selaku koordinator Laboratorium Makmal terpadu yang telah memberi ijin bagi tim peneliti *SHBG* untuk melakukan serangkaian pemeriksaan laboratorium yang diperlukan dalam penelitian ini. Juga kepada Dra.Neneng

Gusniarti serta saudari Abdiyanah Mahyuni dan Sri Supriati dari bagian hormon dan Elisa di Laboratorium Makmal Terpadu, saya ucapkan banyak terima kasih atas bantuannya dalam melakukan pengukuran kadar *SHBG*.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada proyek bantuan Bank Dunia *University Research for Graduate Education (URGE)* atas bantuan biaya penelitian yang telah diberikan. Kepada Dr. Dondin Sayuti selaku Direktur Pusat Penelitian Primata, Institut Pertanian Bogor, saya ucapkan banyak terima kasih atas pemberian sampel serum kera (*Macaca fascicularis*) untuk dipakai sebagai kontrol penelitian. Kepada Dekan FKUI dan Dekan Fakultas Kehutanan, Fakultas Perikanan, dan Fakultas Teknologi Pertanian di Institut Penelitian Bogor saya ucapkan terima kasih atas bantuannya dalam pengumpulan sampel penelitian. Kepada Dr. Beukel dan kawan-kawan dari Kedutaan Besar Jerman di Jakarta serta James Champbell PhD.MPH dan kawan-kawan dari lembaga U.S. NAMRU No. 2 di Jakarta yang telah membantu pengumpulan sampel pria Kaukasia sebagai kelompok kontrol untuk tim peneliti *SHBG* saya ucapkan banyak terima kasih. Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof.Dr. Moestopo (Beragama) selaku pimpinan instansi yang mengirim saya untuk tugas belajar, saya ucapkan terima kasih atas dukungan moral dan materiil sejak saya menjalani masa kuliah hingga dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Tak lupa pula saya sampaikan terima kasih kepada saudara Purwasih, Yuliadi, Jacky dan Dani yang telah banyak membantu selama bertugas di laboratorium Biologi dan administrasi akademik FKUI.

Rasa hormat dan terima kasih yang mendalam saya sampaikan kepada kedua orang tua, kakak dan suami serta kedua anak saya tercinta atas semua doa, bantuan dan dorongannya hingga saya tetap besemangat menjalani dan menyelesaikan pendidikan di Program Magister Biomedik FKUI Jakarta ini.

Akhirnya saya berharap agar penulisan tesis yang masih jauh dari sempurna ini dapat bermanfaat bagi ilmu pengetahuan.

Jakarta, Juli 2002

Penulis

DAFTAR ISI

	HALAMAN
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1. Latar belakang	1
I.2. Masalah	5
I.3. Tujuan penelitian	5
I.4. Hipotesis	6
I.5. Manfaat penelitian	6
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	9
II.1. Gen <i>SHBG</i>	9
II.2. Struktur dan fungsi <i>SHBG</i>	11
II.3. Glikosilasi <i>SHBG</i>	14
II.4. Variasi fenotip <i>SHBG</i>	23
II.5. Pengaturan kadar <i>SHBG</i>	28
II.6. Mekanisme kerja steroid intraseluler dan mekanisme kerja	

steroid melalui reseptor <i>SHBG</i> pada sel target	33
BAB III. BAHAN DAN CARA KERJA	38
III.1.Strategi umum	38
III.2.Bahan, alat dan reagensia	38
III.2.1. Bahan	38
III.2.2. Alat	40
III.2.3. Reagensia	42
III.3. Cara kerja	42
III.3.1. Penyiapan sampel serum	42
III.3.2. Teknik <i>SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)</i>	44
III.3.3. Teknik <i>Western blot</i>	50
BAB IV. HASIL PENELITIAN	56
BAB V PEMBAHASAN	61
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	70
SUMMARY AND CONCLUSION	73
DAFTAR PUSTAKA	75
LAMPIRAN	82
DAFTAR RIWAYAT HIDUP	93

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
I.1. Skema kerangka konsep	8
II.1.1. Idiogram dari kromosom 17	10
II.2.1. Diagram prekursor SHBG manusia	12
II.3.1. Perlekatan rantai samping karbohidrat pada glikoprotein	15
II.3.2. Struktur N-linked oligosakarida, yang terkait pada nitrogen amida dari asparagin	16
II.3.3. Sintesis dari glikoprotein N-linked	18
II.3.4. Proses modifikasi N-linked oligosakarida di dalam aparatus golgi	19
II.4.1. Hasil SDS PAGE dari isolat SHBG pada individu dengan dua pita SHBG dan tiga pita SHBG	27
II.6.1. Skema mekanisme kerja hormon steroid intraseluler	34
II.6.2. Model interaksi antara steroid, SHBG dan reseptor SHBG	37
III.1. Mini-protean electrophoresis cell	41
III.2. Mini-trans blot electrophoresis transfer cell	42
III.3. Memasukkan gel pemisah ke dalam celah diantara tumpukan glass plate	46
III.4. Gel penumpuk mulai berpolimerisasi	47

III.5. <i>Loading</i> larutan protein ke dalam sumur sampel	50
III.6. Menghilangkan gelembung udara dengan tabung reaksi	52
IV.1. Contoh gambaran pola fenotip <i>SHBG</i> dari sampel serum dan kontrol <i>SHBG</i> murni serta <i>SHBG</i> serum kera dari hasil <i>Western blot</i>	57

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
III.1. Komposisi larutan gel pemisah dan gel penumpuk	45
III.2. Komposisi larutan 5x dapar elektroda (<i>running buffer</i>)	48
III.3. Komposisi larutan dapar sampel (<i>sample buffer</i>)	49
IV.1. Hasil perhitungan perkiraan berat molekul masing-masing sub unit <i>SHBG</i>	58
IV.2. Hasil perhitungan jumlah pita <i>SHBG</i> dan rata-rata kadar <i>SHBG</i> pada populasi pria Indonesia dewasa sehat	59
V.1. Jumlah pita <i>SHBG</i> dan kadar <i>SHBG</i> pada sampel serum pria Indonesia dewasa sehat	67

DAFTAR SINGKATAN

ABP	: androgen binding protein
AMP	: adenosine monophosphate
APB	: alkaline phosphatase buffer
APS	: ammonium persulfate
Asn	: asparagin
Asp	: aspartat
ATP	: adenosine triphosphat
BCIP	: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate
BMI	: body mass index
BSA	: bovine serum albumin
cAMP	: cyclic adenosine monophosphate
CBG	: corticosteroid binding globulin
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CHO	: chinese hamster ovary
DMPA	: depot medroxy progesterone acetate
DNA	: deoxyribonucleic acid
EDTA	: ethylenediaminetetra acetic acid
EGF	: epidermal growth factor
FKUI	: fakultas kedokteran universitas Indonesia
FSH	: follicle stimulating hormone

GnRH	: gonadotropin releasing hormone
HCl	: hidrogen chlorida
HepG2	: human hepatoma
IGF-1	: insulin like growth factor-1
IRMA	: immunoradiometric assay
KCL	: kalium chlorida
KB	: keluarga berencana
kDa	: kilo dalton
LH	: luteinizing hormone
LRMW	: low range molecular weight standart
NBT	: nitro blue tetrazolium
PKA	: protei kinase A
rpm	: rotation per minute
RSB	: reduce sample buffer
R _{SHBG}	: reseptor sex hormone binding globulin
SDS PAGE	: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SHBG	: sex hormone binding globulin
SPSS	: statistical product and service solution
TBS	: tris buffer saline
TE	: testosterone enanthate
TEMED	: N,N,N,N-tetra-methyl-ethylene-diamine

TGF- α : transforming growth factor alpha

Thr : threonin

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar belakang

Dalam rangka mencari bahan kontrasepsi pria yang ideal yaitu efektif, aman, reversibel serta tidak mempengaruhi libido dan perilaku seksual, penelitian para ahli andrologi selama ini menunjukkan bahwa penggunaan bahan kontrasepsi hormonal dengan cara penyuntikan *Testosterone Enanthate (TE)* secara tunggal atau dikombinasi dengan penyuntikan *Depot Medroxy Progesterone Acetate (DMPA)* sangat efektif dalam menekan spermatogenesis sampai tingkat azoospermia untuk pria dari bangsa Asia tanpa menimbulkan efek samping yang merugikan kesehatan. Penyuntikan *TE* secara tunggal menyebabkan azoospermia sebesar 91% pada pria di Cina (Gui-Yuan,1990) sedangkan penyuntikan kombinasi *TE + DMPA* menyebabkan azoospermia 95%-100% pada pria Indonesia (Pangkahila,1991; Moeloek,1993). Namun hasil penyuntikan *TE* secara tunggal maupun yang dikombinasi dengan *DMPA* ternyata menunjukkan hasil yang kurang efektif untuk pria dari bangsa Eropa (Kaukasia) yaitu hanya mencapai azoospermia < 70% (Brenner,1977; Wu dan Aitken,1989; WHO,1990). Faktor-faktor yang diduga menimbulkan perbedaan hasil penyuntikan kontrasepsi hormonal tersebut antara pria bangsa Asia dan Kaukasia antara lain adalah variasi genetik dan perbedaan konsumsi makanan antara pria bangsa Asia dan Kaukasia yang mempengaruhi kadar *SHBG*

(*Sex Hormone Binding protein*). (Pangkahila,1991; Moeloek,1993). Dugaan ini diperkuat oleh penelitian Lermite dan Terqui (1991) yang mengatakan bahwa status nutrisi tampaknya juga merupakan faktor pengatur kadar protein pengikat hormon steroid seks atau *SHBG*. Kadar *SHBG* ini secara tidak langsung mungkin dapat mempengaruhi proses spermatogenesis dengan merubah kadar testosteron bebas melalui mekanisme umpan balik negatif pada poros hipotalamus-hipofisis-testis (Rosner,1990; Lermite dan Terqui,1991).

Selain faktor nutrisi (konsumsi makanan), faktor genetik diduga pula dapat mempengaruhi kadar *SHBG* yang mengakibatkan timbulnya perbedaan efektifitas penekanan spermatogenesis oleh bahan kontrasepsi hormonal *TE* maupun *DMPA*. Berdasarkan penelitian Baelen *et al* (1992) diketahui bahwa selain dikode oleh alel normal, *SHBG* ternyata juga dikode oleh alel varian. Produk alel varian *SHBG* (*SHBG* varian) yang telah diidentifikasi terdapat dalam serum manusia, timbul karena adanya mutasi titik pada gen pengkode *SHBG* (Cousin *et al.*,1998). Mutasi titik pada gen pengkode *SHBG* akan menyebabkan substitusi asam amino aspartat menjadi asparagin pada residu asam amino 327 dalam polipeptida *SHBG* yang disertai dengan penambahan tempat untuk N-glikosilasi (Asn-X-Ser/Thr) pada posisi ini (Power *et al.*,1992). Penambahan struktur karbohidrat yang lebih kompleks (glikosilasi) ini menyebabkan penambahan berat molekul *SHBG* varian (Power *et al.*,1992) dan mempengaruhi waktu paruh (*half-life*) dari *SHBG* varian (Cousin *et al.*,1998). Walaupun belum terbukti secara jelas, glikosilasi pada *SHBG* varian ini

juga dianggap dapat mempengaruhi kadar *SHBG* karena menyebabkan waktu paruh yang lebih panjang dan penurunan *metabolic clearance rate SHBG* (Cousin *et al.*,1998). Pada penelitian kadar *SHBG* normal dan *SHBG* yang mengalami deglikosilasi enzimatis yang diekspresikan pada jamur *Pichia pastoris* dikatakan bahwa *SHBG* yang mengalami deglikosilasi memiliki kadar *SHBG* yang lebih rendah dibandingkan dengan *SHBG* normal (dalam hal ini *SHBG* yang tidak mengalami deglikosilasi) (Sui *et al.*,1999). Apakah pada *SHBG* varian yang mengalami glikosilasi seharusnya menghasilkan kadar *SHBG* yang lebih besar daripada *SHBG normal*, masih perlu diteliti lebih lanjut. Variasi fenotip *SHBG* yang telah diketahui dari penelitian dengan teknik *SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis)* dan *Western blot* terdiri dari dua jenis fenotip *SHBG* yaitu **fenotip *SHBG* dua pita** sebagai produk alel normal *SHBG* dan **fenotip *SHBG* tiga pita** sebagai produk alel varian *SHBG* dengan berat molekul yang berbeda (Cousin *et al.*, 1998). Produk alel normal *SHBG* dalam tesis ini selanjutnya akan disebut sebagai *SHBG normal* sedangkan produk alel varian *SHBG* selanjutnya akan disebut sebagai *SHBG varian*. Pemunculan *SHBG* varian yang telah diketahui dari beberapa hasil penelitian di negara lain (Swedia dan Perancis) adalah sebesar 20% (Gershagen,1987) dan 15,7% (Cousin *et al.*,1998). Sedangkan pemunculan *SHBG normal* diketahui sebesar 84,3% (Cousin *et al.*,1998).

Untuk mengetahui efektivitas penggunaan *TE* maupun *DMPA* sebagai kontrasepsi hormonal pria maka penting diketahui kadar *SHBG* dan berbagai faktor

yang mempengaruhinya, antara lain status nutrisi, hormon dan variasi genetik pada orang Asia dibandingkan dengan orang Kaukasia. Oleh karena itulah melalui proyek *URGE (University Research for Graduate Education)* di bagian Biologi FKUI (Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia), dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memeriksa pengaruh status gizi/nutrisi dan variasi fenotip *SHBG* terhadap kadar *SHBG* pada pria Indonesia dewasa sehat dengan menggunakan pria Kaukasia sebagai kelompok kontrol. Sebagai bagian dari proyek penelitian yang merupakan penelitian payung, maka penulis mendapat kesempatan untuk mengadakan penelitian yang bertujuan memeriksa variasi fenotip *SHBG* pada pria Indonesia dewasa sehat serta kemungkinan pengaruhnya terhadap kadar *SHBG* (Lihat lampiran 1).

Mengingat penelitian sebelumnya telah menyebutkan adanya pemunculan *SHBG normal* dan *SHBG varian* dengan persentase yang berbeda dan dianggap bahwa faktor genetik mempengaruhi kadar *SHBG*, sedangkan di Indonesia belum ada data-data yang menyebutkan adanya variasi genetik (variasi fenotip) *SHBG* pada pria dewasa sehat serta pengaruhnya terhadap kadar *SHBG* maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut melalui proyek penelitian ini. Penelitian yang baru pertama kali dilakukan terhadap pria Indonesia dewasa sehat ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai variasi fenotip *SHBG* yang terdapat pada pria Indonesia dewasa sehat serta kemungkinan pengaruhnya terhadap kadar *SHBG*, yang sampai saat ini belum diketahui secara jelas.

I.2. Masalah

Metode kontrasepsi hormonal pria belum sepenuhnya mencapai tingkat keberhasilan yang diharapkan. Salah satu faktor yang diduga sebagai penyebabnya adalah karena adanya variasi genetik (variasi fenotip) *SHBG*. *SHBG* varian yang dihasilkan sebagai akibat adanya mutasi titik pada gen *SHBG* dianggap dapat mempengaruhi kadar *SHBG* yang berperan penting dalam proses penekanan spermatogenesis oleh bahan kontrasepsi hormonal *TE* maupun *DMPA*. Yang menjadi pertanyaan adalah apakah variasi fenotip *SHBG* tersebut mempengaruhi kadar *SHBG*?

I.3. Tujuan Penelitian

I.3.1. Tujuan Umum

Mendeteksi adanya variasi fenotip *SHBG* pada pria Indonesia dewasa sehat serta kemungkinan pengaruhnya terhadap kadar *SHBG*.

I.3.2. Tujuan khusus

- Melihat variasi fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat.
- Memeriksa kadar *SHBG* dari seluruh jenis fenotip *SHBG* yang terdapat pada populasi pria Indonesia dewasa sehat.
- Membandingkan kadar *SHBG* dari masing-masing jenis fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat

I.4. Hipotesis

- Terdapat variasi fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat.
- Terdapat perbedaan kadar *SHBG* dari masing-masing jenis fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat

I.5. Manfaat Penelitian

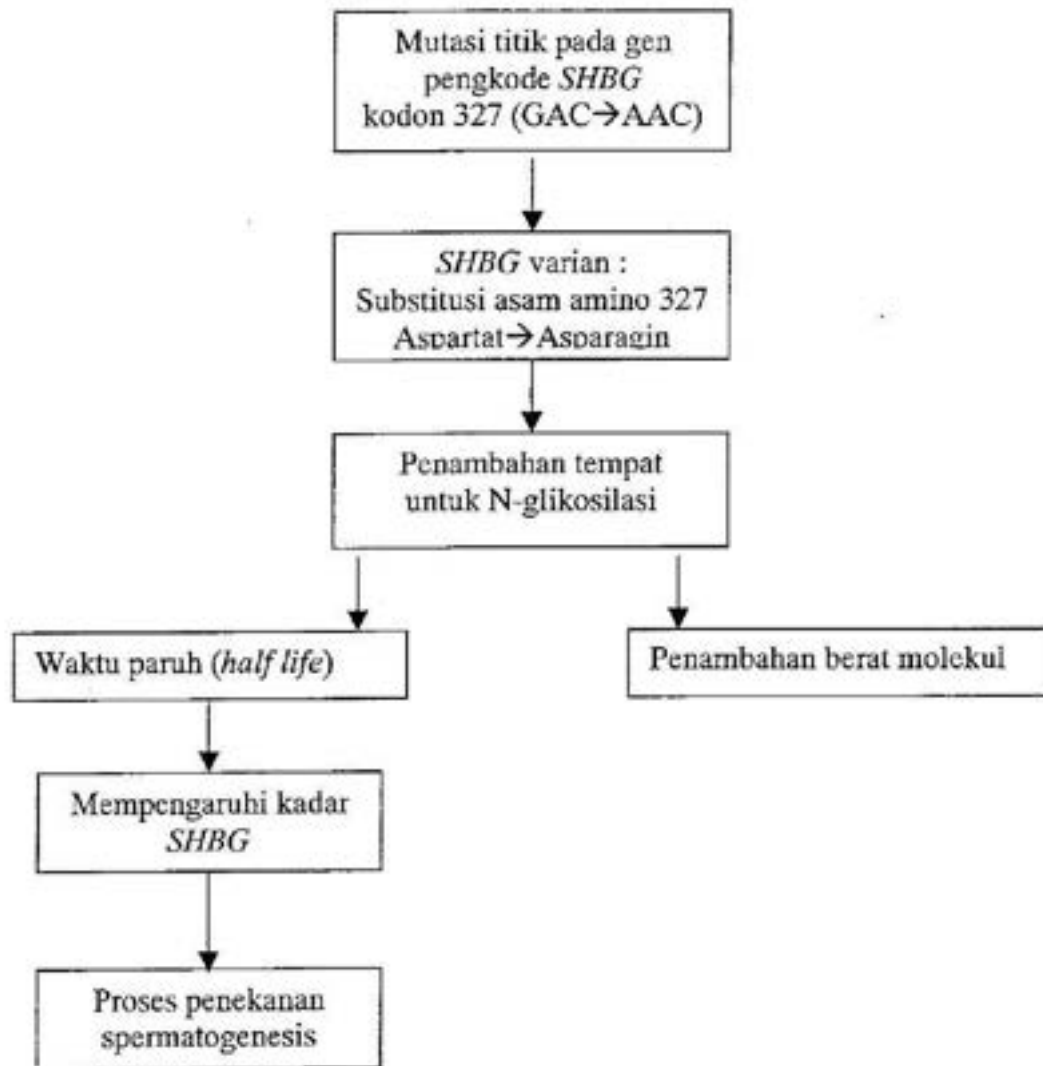
Penelitian yang mendeteksi adanya variasi fenotip *SHBG* serta kemungkinan pengaruhnya terhadap kadar *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat ini diharapkan mampu memberikan sumbangan terhadap perkembangan cabang ilmu biologi molekular di Indonesia dalam hal pengetahuan mengenai variasi fenotip *SHBG* yang terdapat pada pria Indonesia dewasa sehat. Selain itu juga diharapkan bila ternyata dari hasil penelitian ini terbukti bahwa variasi fenotip *SHBG* memiliki pengaruh terhadap kadar *SHBG*, maka dapat dijadikan bahan pertimbangan untuk menyeleksi penggunaan bahan kontrasepsi hormonal pria berdasarkan jenis fenotip *SHBG* tertentu. Dengan demikian diharapkan dapat membantu meningkatkan keberhasilan pelaksanaan kontrasepsi hormonal dalam program KB (Keluarga Berencana) khususnya pada pria.

KERANGKA KONSEP

Variasi fenotip *SHBG* diduga terdapat pada pria Indonesia dewasa sehat. *SHBG* varian muncul karena adanya mutasi titik pada gen pengkode *SHBG* yang terletak pada lengan pendek kromosom 17 tepatnya dibagian ekson 8 pada kodon 327 (GAC→AAC) yang akan menyebabkan terjadinya substitusi asam amino aspartat→asparagin pada residu asam amino 327 dalam polipeptida *SHBG*, yang disertai dengan penambahan tempat untuk N-glikosilasi (Asn-X-Ser/Thr) pada posisi ini.

Penambahan struktur karbohidrat yang lebih kompleks ini akan menyebabkan penambahan berat molekul *SHBG* varian dan berpengaruh terhadap waktu paruh (*half life*) dari *SHBG* varian tersebut. Walaupun belum terbukti secara jelas, glikosilasi pada *SHBG* varian juga dianggap dapat mempengaruhi kadar *SHBG* karena menyebabkan waktu paruh yang lebih panjang. Selain itu berdasarkan penelitian deglikosilasi enzimatis *SHBG* manusia yang diekspresikan pada jamur *Pichia pastoris* disebutkan bahwa *SHBG* yang mengalami deglikosilasi ternyata mensekresi kadar *SHBG* yang lebih rendah dibandingkan *SHBG* normal (dalam hal ini *SHBG* yang tidak mengalami deglikosilasi). Apakah pada *SHBG* varian yang mengalami glikosilasi seharusnya menghasilkan kadar yang lebih besar daripada *SHBG* normal, masih perlu diteliti lebih lanjut. Kadar *SHBG* secara tidak langsung mungkin dapat mempengaruhi proses penekanan spermatogenesis dengan merubah

kadar testosteron bebas yang bekerja menimbulkan efek umpan balik negatif pada sistim poros hipotalamus-hipofisis-testis. Secara skematis kerangka konsep dapat dilihat pada gambar berikut :



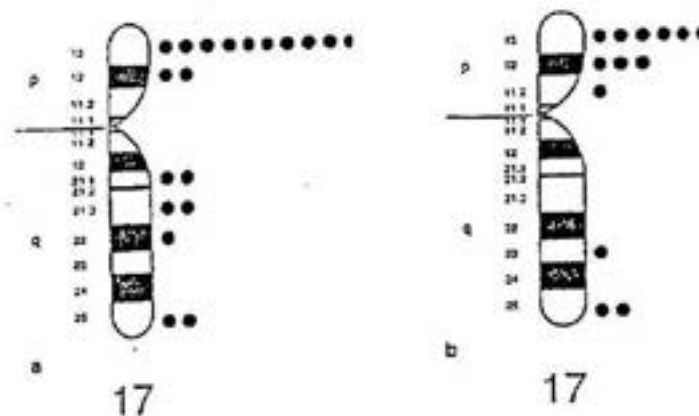
Gambar I .1. Skema kerangka konsep

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. Gen *SHBG*

Globulin pengikat hormon seks atau *sex hormone binding globulin (SHBG)* pertama kali ditemukan melalui penelitian yang dilakukan oleh Mercier *et al* pada tahun 1966 yang memisahkan *SHBG* dari albumin dan *CBG (Corticosteroid Binding Globulin)* dengan teknik elektroforesis (Anderson, 1974). Studi genetika konvensional telah mengindikasikan bahwa *SHBG* manusia dikode oleh suatu gen autosom tunggal (Luckcock dan Cavalli-Sforza, 1983) dengan dua alel autosom kodominan (Baelen *et al*, 1992). Dari penelitian secara hibridisasi *in situ* pada metafase kromosom manusia dengan dua probe khusus diketahui bahwa gen pengkode *SHBG* ini berlokasi di lengan pendek kromosom 17 (17p12->p13) (Gambar II.1.1) dan terdiri dari 8 ekson yang dipisahkan oleh 7 intron kecil (Berube, 1990).

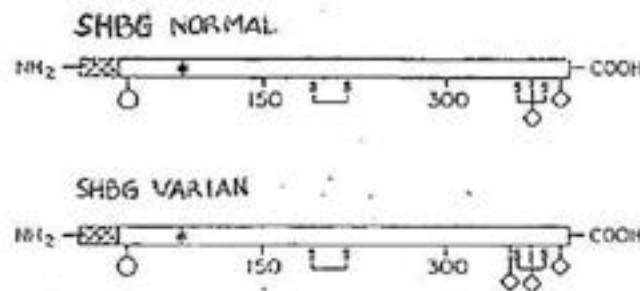


Gambar II.1.1. Idiogram dari kromosom 17. (a) Hibridisasi dengan probe *SHBG* (3') menunjukkan 62% dari *silver grain* berada pada pita p12-p13. (b) Hibridisasi dengan probe *SHBG* (5') menunjukkan 69% dari *silver grain* berada pada pita p12-p13. Dari kedua hasil tersebut, pita p13 dari kromosom 17 menunjukkan konsentrasi *silver grain* yang maksimal (Berube *et al.*, 1990).

Gen pengkode *SHBG* tampaknya juga mengkode *Androgen Binding Protein* (*ABP*) atau protein pengikat androgen yang diproduksi oleh sel-sel sertoli di testis. *SHBG* dan *ABP* sebagai glikoprotein homodimerik dengan satu tempat pengikatan steroid (*steroid binding site*), memiliki struktur primer yang sama namun berbeda dalam hal jenis oligosakarida yang melekat pada masing-masing *SHBG* serta *ABP*. Ekspresi dari gen *SHBG* telah dideteksi terdapat dalam beberapa jaringan, termasuk hati, testis, plasenta, otak dan endometrium. Transkrip yang mengkode *SHBG* di hati ternyata identik dengan yang mengkode *ABP* di testis (Hammond, 1996).

II.2. Struktur dan fungsi *SHBG*

Dari sekuens asam amino *SHBG* manusia yang ditetapkan melalui sekuensing polipeptida *SHBG* plasma murni secara langsung (Walsh *et al.*, 1986) dan sekuensing nukleotida *SHBG* dari produk *complementary DNA* (*cDNA*) (Hammond *et al.*, 1987), diketahui bahwa prekursor polipeptida *SHBG* manusia terdiri dari 402 asam amino dengan 29 residu pertama sebagai polipeptida sinyal (Gambar II.2.1). Sedangkan polipeptida *mature SHBG* terdiri dari 373 residu asam amino dengan dua jembatan disulfida dan mengandung tiga rantai samping karbohidrat. Dua jembatan disulfida tersebut masing-masing menghubungkan Cys-164 dengan Cys-188, dan Cys-333 dengan Cys-361 (Walsh *et al.*, 1986). Sebagai molekul homodimerik, tiap monomer atau sub unit *SHBG* mengandung satu tempat/kedudukan O-glikosilasi pada posisi *threonin* 7, ditambah dua tempat/kedudukan potensial N-glikosilasi pada posisi asparagin 351 dan 367, yang diisi oleh struktur karbohidrat *biantennary* dari jenis N-asetilgalaktosamin. Seluruh rantai karbohidrat ini diakhiri oleh residu asam N-asetilneuraminik (asam sialik) (Avvakumov *et al.*, 1983; Walsh *et al.*, 1986).



Gambar II.2.1. Diagram yang menggambarkan prekursor *SHBG* manusia. Persegi panjang menggambarkan prekursor *SHBG* dengan jumlah asam amino (402 residu) tertera di bawahnya. Peptida sinyal ditunjukkan oleh tanda silang. Lokasi dari dua jembatan disulfida ditunjukkan oleh lambang S-S. Lokasi dua tempat N-glikosilasi atau glikosilasi Asparagin (Asparagin-X-Serin/Threonin) ditunjukkan oleh lambang *diamond*. Tempat/kedudukan O-glikosilasi ditunjukkan oleh lambang lingkaran. Tanda bintang menunjukkan lokasi daerah pengikatan reseptor (Joseph,1994).

SHBG merupakan suatu glikoprotein homodimerik plasma yang secara spesifik mengikat dan membawa hormon-hormon seks steroid (dehidrotosteron, testosteron dan estradiol) ke jaringan target pada beberapa spesies, termasuk manusia (Cousin *et al.*,1998; Grishkovskaya *et al.*, 2000). Hormon-hormon seks steroid ini dihasilkan dari korteks adrenal, gonad dan plasenta. Estradiol dan progesteron merupakan hormon seks steroid yang penting untuk wanita, sedangkan testosteron merupakan hormon seks steroid yang penting untuk pria (Greenspan,1994). Pada plasma normal manusia, *SHBG* mengikat kira-kira 44 % hormon testosteron sedangkan 54% testosteron sisanya terikat pada albumin dan hanya kira-kira 2 % dari testosteron yang terdapat dalam keadaan bebas (Nieschlag and Behoe.,1997).

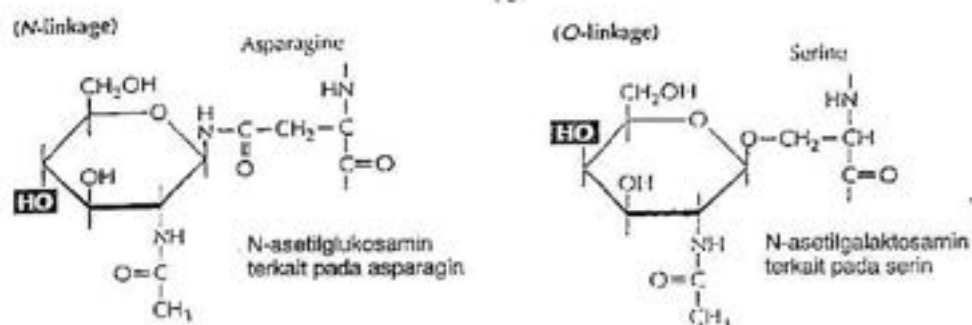
Berat molekul *SHBG* kira-kira 85-100 kDa (Petra *et al.*,1983) . Sebagai molekul homodimerik, *SHBG* terdiri dari dua monomer yang identik dan memiliki satu *steroid binding site* atau tempat pengikatan steroid pada tiap dimernya (Petra *et al.*,1983; Petra *et al.*,1986). Jika dibandingkan dengan albumin, *SHBG* memiliki afinitas yang lebih besar namun kapasitas pengikatannya lebih rendah terhadap testosteron. Afinitas *SHBG* pada hormon steroid yang terkuat secara berurutan adalah terhadap dehidrotestosteron ($0,99 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ pada 37°C), testosteron ($0,35 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ pada 37°C), dan estradiol ($0,22 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ pada 37°C) (Rosner *et al.*,1975). Dengan adanya kemampuan *SHBG* untuk mengikat hormon-hormon steroid seks ini, *SHBG* dapat mempengaruhi keseimbangan kadar hormon-hormon steroid seks di dalam sirkulasi dan mempengaruhi distribusi biologisnya ke jaringan target (Pugeat *et al.*,1996). Bila dihubungkan dengan proses spermatogenesis pada pria, kadar *SHBG* secara tidak langsung mungkin dapat mempengaruhi spermatogenesis melalui pengaturan kadar testosteron bebas yang bekerja menimbulkan efek umpan balik negatif pada sistim poros hipotalamus-hipofisis-testis (Rosner,1990; Lermite dan terqui,1991). Dari salah satu penelitian disebutkan adanya dugaan bahwa bila kadar *SHBG* yang mengikat testosteron makin rendah maka kadar testosteron bebas yang beredar dalam sirkulasi darah akan makin besar (Sutyarso,1997).Kadar testosteron bebas yang tinggi ini akan menghambat hipotalamus untuk mensekresi *GnRH* (*Gonadotropin Releasing Hormone*) sehingga menghambat hipofisis anterior untuk mensekresi gonadotropin dalam hal ini adalah hormon *FSH* (*Folilicle Stimulating*

Hormone) dan hormon *LH* (*Luteinizing Hormone*) (Nieschlag dan Behoe,1997). Hormon *LH* berfungsi merangsang sel leydig untuk mensintesis dan mensekresi testosteron. Sedangkan hormon *FSH* berfungsi merangsang sel sertoli untuk mensintesis *ABP*, memelihara pertumbuhan sel germinal, meningkatkan sensitivitas sel leydig terhadap *LH* pada proses steroidogenesis, memulai spermatogenesis tahap mitosis serta menyempurnakan spermatogenesis pada fase spermiogenesis dan spermiasi (Steinberger,1979; Nieschlag dan Behoe,1997). Dengan tidak disekresikannya *FSH* dan *LH* maka spermatogenesis tidak dapat dimulai. Dengan demikian proses spermatogenesis yang merupakan rangkaian proliferasi dan diferensiasi sel spermatogonia di dalam tubulus seminiferus testis untuk membentuk spermatozoa, akan mengalami hambatan (Clermont,1972; Nieschlag dan Behoe,1997).

II.3. Glikosilasi *SHBG*

Pada sel eukariotik beberapa proteinnya mengalami proses modifikasi antara lain glikosilasi. Protein yang mengalami glikosilasi atau penambahan rantai karbohidrat disebut sebagai *glikoprotein*. Glikoprotein diklasifikasikan sebagai *N-linked* atau *O-linked*, tergantung pada tempat perlekatan rantai karbohidratnya. Pada glikoprotein jenis *N-linked* rantai karbohidratnya melekat pada atom nitrogen rantai samping dari asparagin. Sedangkan pada glikoprotein jenis *O-linked* rantai karbohidratnya melekat pada atom oksigen rantai samping dari serin atau treonin. Gula yang secara langsung

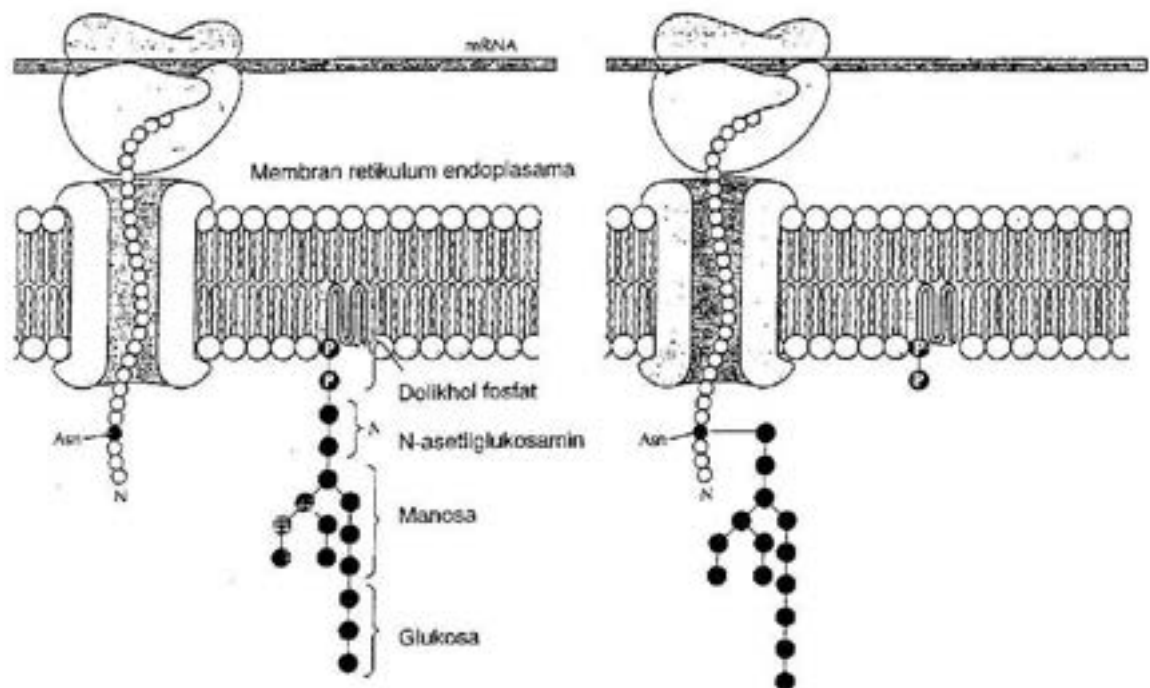
melekat pada posisi ini biasanya adalah N-asetilglukosamin atau N-asetilgalaktosamin (Gambar II.3.1) (Cooper,2000).



Gambar II.3.1. Perlekatan rantai samping karbohidrat pada glikoprotein. Rantai karbohidrat dari *N-linked* glikoprotein melekat pada asparagin; *O-linked* glikoprotein melekat pada serin (seperti yang diperlihatkan dalam gambar) atau treonin. Gula yang berhubungan dengan asam amino biasanya N-asetilglukosamin (*N-linked*) atau N-asetilgalaktosamin (*O-linked*) (Cooper,2000).

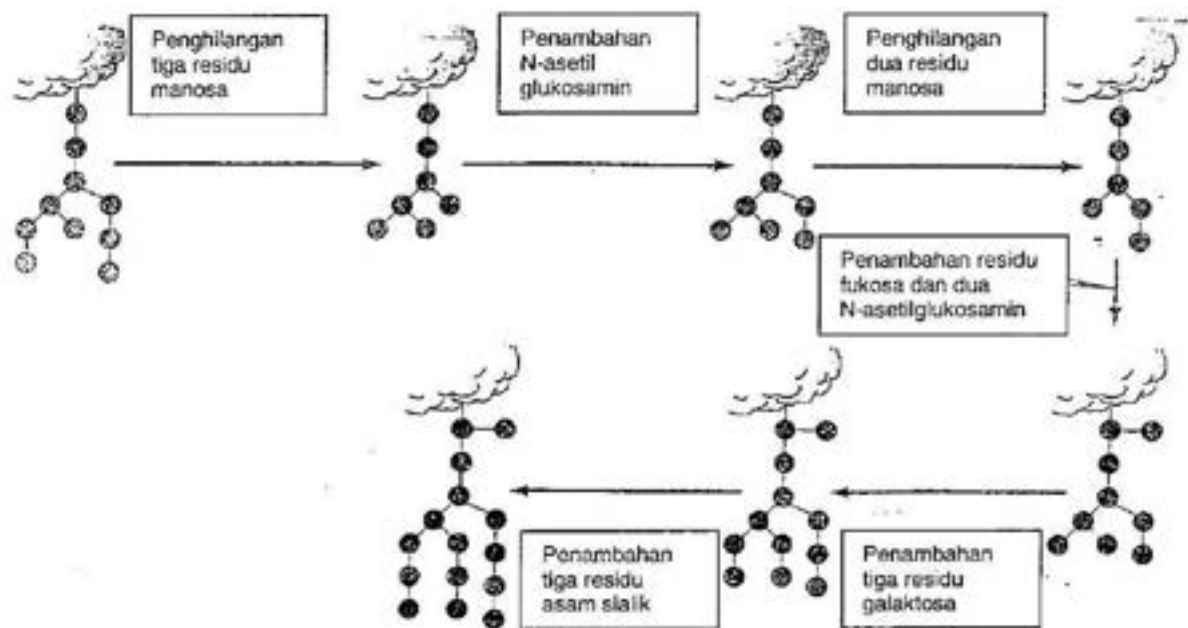
Struktur *N-linked* oligosakarida terdiri dari N-asetilglukosamin, manosa, fukosa, galaktosa dan N-asam asetilneuraminik atau asam sialik (Gambar II.3.2) (Lodish *et al.*,1995).

sekuens Asn-X-Ser atau Asn-X-Thr (dimana X adalah asam amino selain proline). Pada proses selanjutnya oligosakarida *N-linked* kemudian dimodifikasi. Tiga residu gula dan satu manosa dihilangkan ketika glikoprotein berada didalam retikulum endoplasma (Gambar II.3.3). Glikoprotein kemudian ditransfer ke aparatus golgi dimana oligosakarida dimodifikasi lebih lanjut. Modifikasi ini meliputi penghilangan atau penambahan residu karbohidrat (Cooper,2000).



Gambar II.3.3. Sintesis dari glikoprotein *N-linked*. Tahap pertama glikosilasi adalah penambahan suatu oligosakarida yang terdiri dari 14 residu gula kepada rantai polipeptida yang sedang dibuat di dalam retikulum endoplasma. Oligosakarida (yang terdiri dari 2 residu N-asetilglukosamin, 9 manosa dan 3 glukosa) dirakit pada suatu *lipid carrier* (dolikhofosfat) di dalam membran retikulum endoplasma, kemudian ditransfer sebagai suatu unit kepada akseptor asparagin dari polipeptida (Cooper, 2000).

Proses modifikasi yang pertama adalah penghilangan tiga residu manosa. Lalu diikuti oleh penambahan satu residu N-asetilglukosamin, penghilangan dua atau lebih residu manosa dan penambahan satu residu fukosa serta dua atau lebih residu N-asetilglukosamin. Proses modifikasi yang terakhir adalah penambahan tiga residu galaktosa dan tiga residu N-asetilneuraminik (Gambar II.3.4) (Cooper, 2000)



Gambar IL3.4. Proses modifikasi N-linked oligosakarida di dalam aparatus golgi. N-linked oligosakarida dari glikoprotein dibawa dari retikulum endoplasma dan dimodifikasi lebih lanjut melalui tahapan reaksi di dalam aparatus golgi (Cooper,2000).

N-linked oligosakarida dari berbagai protein yang berbeda diproses menjadi bentuk yang berbeda, tergantung pada enzim yang ada di dalam sel dimana sintesis terjadi dan kemudahan oligosakarida dicapai oleh enzim yang mengkatalis modifikasi. O-linked oligosakarida juga mengalami penambahan di aparatus golgi. Berbeda dengan N-linked oligosakarida, O-linked oligosakarida dibentuk melalui penambahan satu gula dan biasanya terdiri dari hanya sedikit residu (Cooper,2000)..

SHBG sebagai suatu glikoprotein plasma homodimerik, pada tiap sub unitnya mengandung satu tempat O-glikosilasi pada posisi *threonin* 7 ditambah dua tempat

potensial N-glikosilasi pada posisi asparagin 351 dan 367 yang diisi oleh struktur karbohidrat dari jenis N-asetilgalaktosamin. Dengan demikian komponen karbohidrat *SHBG* manusia dibentuk oleh dua rantai oligosakarida *biantennary* dari jenis N-asetilgalaktosamin dan satu rantai oligosakarida yang terikat pada O-glikosida. Seluruh rantai karbohidrat ini diakhiri oleh residu N-asam asetilneuraminik (asam sialik) (Avvakumov,1988; Bocchinfuso *et al.*,1992; Cousin *et al.*,1998).

Peranan efektif dari glikosilasi *SHBG* belum diketahui secara jelas. Deglikosilasi enzimatis dari *SHBG* manusia produk *cDNA* yang diekspresikan pada *Pichia pastoris* dan penghilangan tempat/kedudukan glikosilasi melalui *site-directed mutagenesis* dari *SHBG* manusia produk *cDNA* yang diekspresikan pada sel-sel ovarium hamster cina (*Chinese Hamster Ovary* = *CHO*) telah diketahui tidak memiliki atau hanya sedikit memiliki pengaruh terhadap aktivitas pengikatan dan spesifisitas terhadap steroid serta terhadap dimerisasi *SHBG* (Bocchinfuso *et al.*, 1992; Sui *et al.*,1999). Penghilangan rantai karbohidrat pada deglikosilasi enzimatis juga tidak berpengaruh terhadap stabilitas dan konformasi aktif dari *SHBG* (Sui *et al.*,1999). Namun keberadaan komponen atau rantai karbohidrat dari glikoprotein ini disisi lain diketahui telah berpengaruh terhadap penambahan berat molekul *SHBG* varian (Baelen *et al.*,1992) serta waktu paruh biologis dari *SHBG* varian (Cousin *et al.*,1998). Selain itu penambahan rantai karbohidrat ini juga dianggap memiliki peran penting untuk interaksi dengan reseptor pengikat membran (*membran-bound receptor*) dan untuk memulai proses transduksi sinyal pada membran sel

(Bocchinfuso *et al.*,1992). Pengaruh penambahan tempat untuk glikosilasi terhadap waktu paruh biologis dari *SHBG* varian manusia telah diteliti menggunakan *SHBG* manusia yang telah dimurnikan dan dilabel dengan biotin yang kemudian disuntikkan ke hewan kelinci. Kelinci dipilih dengan pertimbangan bahwa kedua spesies memiliki sekuens homolog. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa waktu paruh *SHBG* yang dimurnikan dari serum homozigot varian (v/v) lebih tinggi secara bermakna dibandingkan *SHBG* yang dimurnikan dari serum heterozigot varian (W/v) dan dengan *SHBG* yang dimurnikan dari serum normal (*wild-type*) (W/W) (Cousin *et al.*,1998).

Peneliti lain mempelajari peranan komponen karbohidrat *SHBG* manusia di dalam interaksi dengan sistim pengenalan kompleks *SHBG*-estrogen pada membran plasma sel desidua endometrium. Terlihat bahwa penghilangan residu N-asam asetilneuraminik (asam sialik) dari rantai oligosakarida *SHBG* tidak menyebabkan perubahan aktivitas pengikatan *SHBG* terhadap steroid, namun menyebabkan hilangnya kemampuan *SHBG* untuk berinteraksi secara spesifik terhadap sistim pengenalan membran. Dari hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa rantai-rantai oligosakarida *SHBG* turut menentukan pengenalan kompleks *SHBG*-estrogen oleh membran plasma sel endometrium (Avvakumov *et al.*,1988).

Pada penelitian tentang ekspresi heterolog *wild-type* (normal) dan *full deglycosylated* (yang mengalami deglikosilasi enzimatis) *SHBG* manusia produk *cDNA* yang diekspresikan pada jamur *Pichia pastoris* ditunjukkan bahwa *SHBG*

normal yang tidak mengalami deglikosilasi pada penelitian ini, memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan *SHBG* yang mengalami deglikosilasi enzimatis. Berat molekul yang lebih besar ini menunjukkan adanya rantai oligosakarida yang lebih panjang dengan jumlah unit monosakarida yang berbeda. *SHBG* yang mengalami deglikosilasi enzimatis diketahui juga ternyata mensekresi *SHBG* dengan kadar yang lebih rendah yaitu 1,5 mg/L dibandingkan *SHBG* normal yang mensekresi *SHBG* sebesar 4 mg/L. Dari hasil penelitian tersebut dianggap bahwa rantai oligosakarida berperan dalam sekresi *SHBG* pada sistem ekspresi *Pichia pastoris* sebagaimana sekresi *SHBG* plasma manusia oleh hati dan berperan dalam menurunkan laju *metabolic clearance* dari *SHBG*. Disimpulkan juga bahwa peranan rantai oligosakarida atau komponen karbohidrat dari *SHBG* adalah menjaga atau mempertahankan kadar *SHBG* yang adekuat dalam plasma (Sui *et al.*, 1999). Namun apakah pada produk *SHBG* varian yang mengalami glikosilasi atau penambahan oligosakarida kadar *SHBG* yang dihasilkan seharusnya lebih besar dari pada produk *SHBG* normal, masih perlu diteliti lebih lanjut.

Pendapat yang agak berbeda berkaitan dengan pengaruh rantai karbohidrat terhadap sekresi *SHBG*, muncul pada penelitian mutan *SHBG* manusia dari produk *cDNA* yang diekspresikan pada sel *CHO* (*Chinese Hamster Ovary*). Pada penelitian tersebut dikatakan bahwa deglikosilasi atau penghilangan rantai karbohidrat secara tersendiri (individual) dari glikoprotein ini tidak mempengaruhi produksi *SHBG* oleh sel *CHO*, namun hilangnya dua rantai N-linked oligosakarida menyebabkan

berkurangnya kadar *SHBG* dalam medium kultur ini tanpa menghiraukan ada atau tidaknya rantai O- linked oligosakarida. Karena itulah glikosilasi atau keberadaan rantai karbohidrat dianggap bukan merupakan syarat mutlak untuk biosintesis atau sekresi *SHBG* namun mungkin berpengaruh pada efisiensi dari proses biosintesis atau sekresi *SHBG* tersebut (Bocchinfuso *et al.*,1992)

II.4. Variasi fenotip *SHBG*

Penelitian Baelen *et al* (1992) telah menyebutkan bahwa *SHBG* manusia di seluruh dunia dikode oleh dua alel autosom kodominan yaitu alel normal dan alel varian. Insiden dan distribusi alel varian yang terdapat dalam populasi alami dapat dianggap sebagai akibat menyeluruh dari tiga macam proses utama melalui banyak generasi yang terdahulu yaitu : mutasi, seleksi alam dan pengaruh peluang atau penyimpangan genetik acak (Harris,1994).

Mutasi pada dasarnya terjadi dengan sifat yang acak dan dapat melalui berbagai mekanisme diantaranya berupa penambahan (adisi), penghapusan (delesi), dan substitusi suatu nukleotida atau basa tunggal dari molekul *DNA*. Mutasi dapat menyebabkan dihasilkannya suatu alel baru atau alel varian dan menyebabkan perubahan genotip yang berbeda dari genotip normal (Harris,1994; Marks,1987).

SHBG varian muncul karena adanya mutasi titik pada ekson 8 dari gen pengkode *SHBG* manusia (Cousin *et al.*,1998). Mutasi titik ini menyebabkan substitusi satu basa pada kodon 327 GAC menjadi AAC yang mengkode substitusi

asam amino aspartat menjadi asparagin (Asp327Asn) dan juga menyebabkan adanya penambahan tempat untuk N-glikosilasi pada posisi ini (Cousin *et al.*,1998). Power *et al* (1992) dalam penelitiannya menganggap bahwa peningkatan berat molekul *SHBG* varian manusia yang diidentifikasi dengan teknik *Western blot* merupakan akibat dari penambahan rantai karbohidrat N-linked. Glikosilasi *SHBG* manusia ini telah diketahui berperan dalam menentukan waktu paruh biologis dan keberadaannya di dalam sirkulasi darah (Larrea *et al.*,1995; Cousin *et al.*,1998). *SHBG* varian yang mengalami penambahan tempat untuk N-glikosilasi juga dianggap dapat menimbulkan variasi kadar *SHBG* karena memiliki waktu paruh yang lebih panjang dan berpengaruh terhadap penurunan *metabolic clearance rate* dari *SHBG* (Cousin *et al.*,1998). Namun *SHBG* varian ini tidak menunjukkan adanya hubungan dengan kondisi patologis atau implikasi klinis dan tidak terdapat perbedaan statistik yang bermakna pada sifat pengikatan steroidnya (Baelen *et al.*,1992).

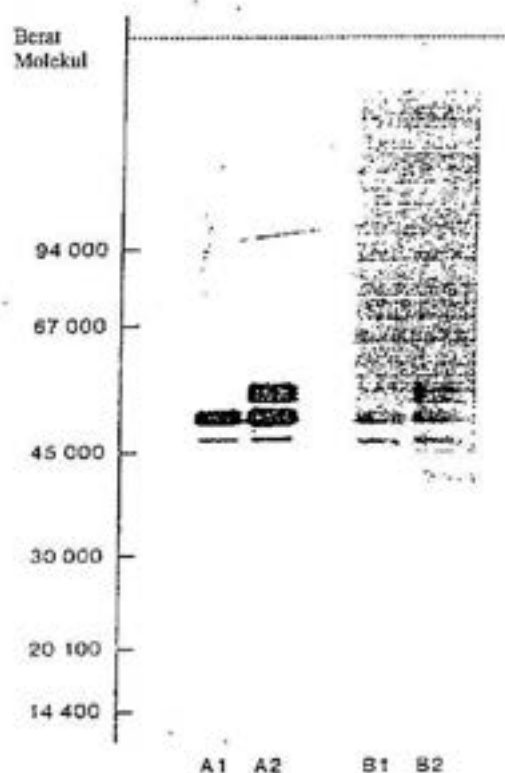
Berdasarkan penelitian Gershagen *et al* (1987) dengan teknik *SDS PAGE* menggunakan 121 serum sampel individu sehat, diperlihatkan bahwa sebagian besar subyek yang telah diteliti tersebut isolat *SHBG*nya terdiri dari dua sub unit dengan berat molekul yang berbeda. Sub unit *heavy* dengan berat molekul 52 kDa memiliki perbandingan kuantitatif intensitas pewarnaan 10:1 terhadap sub unit *light* dengan berat molekul 49 kDa yang bersama-sama membentuk gambaran fenotip *SHBG* dua pita. Subyek penelitian sisanya membentuk gambaran fenotip *SHBG* tiga pita karena diketahui mengandung tambahan pita ketiga sebagai sub unit *super heavy* dengan

berat molekul sebesar 56 kDa. (Gambar II.4.1). Berdasarkan data sekuens N-terminal dan sekuens *SHBG* manusia produk cDNA, *SHBG* dianggap sebagai suatu glikoprotein homodimer yang memiliki dua sub unit *SHBG* yang sama walaupun memiliki berat molekul yang berbeda (Walsh *et al.*, 1986). Anggapan tersebut juga ditunjang oleh hasil penelitian secara imunokimia yang memperlihatkan adanya beberapa epitop yang sama, pada masing-masing sub unit *SHBG* (Hammond *et al.*, 1986). Dari penelitian deglikosilasi enzimatis pada *SHBG* manusia diketahui bahwa perbedaan berat molekul masing-masing sub unit *SHBG* tersebut disebabkan karena perbedaan proses glikosilasi dari masing-masing sub unit *SHBG*. Sub unit *heavy SHBG* memiliki berat molekul yang lebih besar karena mengalami proses glikosilasi yang lebih banyak (memiliki dua rantai *N-linked* oligosakarida) dibandingkan sub unit *light SHBG* (hanya memiliki satu rantai *N-linked* oligosakarida). Namun mekanisme yang mengatur proses glikosilasi yang berbeda antara sub unit *heavy* dan *light SHBG* sebagai komponen penyusun dimer *SHBG* tersebut masih belum jelas (Danzo *et al.*, 1989).

Dari beberapa penelitian tentang fenotip *SHBG* yang telah dilakukan, secara umum didapat kesamaan tentang adanya jenis fenotip *SHBG* dua pita dan fenotip *SHBG* tiga pita. Namun berat molekul masing-masing sub unit dari fenotip *SHBG* yang diperoleh melalui teknik *SDS PAGE* dan *Western blot* tampaknya menunjukkan hasil yang agak bervariasi. Sub unit *light* memiliki berat molekul yang berkisar antara 42-49 kDa, sub unit *heavy* memiliki berat molekul berkisar antara 44-52 kDa

sedangkan sub unit *super heavy* memiliki berat molekul yang berkisar antara 56-60 kDa (Turner *et al.*,1984; Gershagen *et al.*,1987; Power *et al.*,1992; Cousin *et al.*,1998; Cornelisse *et al.*,1994).

Pada pemeriksaan saringan 121 individu sehat dengan prosedur isolasi *SHBG* skala kecil pada suatu kolom antibodi yang diikuti dengan *Western immunoblotting*, terlihat sebanyak 20% subyek memiliki gambaran fenotip *SHBG* tiga pita sebagai *SHBG* varian (Gershagen *et al.*,1987). Dari penelitian lain pada penderita dengan kondisi patologis (kelainan endokrin) menggunakan teknik *Western blot* juga disebutkan adanya pemunculan *SHBG* varian sebesar 15,7 % dan *SHBG normal* sebesar 84,3% dengan frekuensi alel normal sebesar 0,917 dan frekuensi alel varian sebesar 0,083 (Cousin *et al.*,1998). Namun distribusi alel normal dan alel varian *SHBG* ini diketahui sangat bervariasi diantara populasi dari berbagai negara (Baelen *et al.*,1992).



Gambar II.4.1 . Hasil *SDS-PAGE* dari isolat *SHBG* pada individu dengan dua pita *SHBG* (A1, B1) dan pada individu dengan tiga pita *SHBG* (A2, B2). Di sebelah kiri (A1, B1) diperlihatkan hasil yang diperoleh dari pewarnaan *SHBG* dengan *coomassie brilliant blue*. Di sebelah kanan (A2, B2) diperlihatkan hasil yang diperoleh dari *immunostaining* dengan poliklonal anti *SHBG* anti serum setelah *blotting* di kertas nitoselulosa (Gershagen *et al.*,1987).

II.5. Pengaturan kadar SHBG

SHBG plasma manusia disintesis terutama di organ hati dan kemudian disirkulasikan ke dalam pembuluh darah (Rosner *et al.*,1984). Kadar *SHBG* normal dalam plasma darah manusia adalah 10-73 nmol/L(*DPC IRMA Count*).

Pengaturan kadar *SHBG* sebagai suatu glikoprotein plasma yang mengikat hormon steroid secara spesifik, dipengaruhi oleh beberapa faktor. Berdasarkan konsep yang telah dianut selama lebih dari 20 tahun, hormon-hormon steroid seks atau steroid gonad endogen dianggap sebagai pengatur fisiologis utama dari *SHBG* karena pada kenyataannya kadar *SHBG* lebih tinggi pada wanita dibandingkan pada pria dan kadar *SHBG* meningkat selama masa kehamilan (Toscano *et al.*,1992 ; Hampl dan Starka,1996). Disamping itu berdasarkan pengamatan klinis dari beberapa penelitian juga telah dilaporkan bahwa baik pada pria maupun wanita, pemberian estrogen ternyata dapat meningkatkan kadar *SHBG*, sedangkan pemberian androgen masih menjadi kontroversi karena menyebabkan penurunan maupun peningkatan kadar *SHBG* (Cox,1972 dalam Loukovaara *et al.*,1995; Anderson,1974; Plymate *et al.*,1983). Meskipun demikian kadar *SHBG* pada beberapa kondisi fisiologis dan patologis tidak dapat dijelaskan hanya berdasarkan pada mekanisme pengontrolan oleh hormon steroid . Pengaturan kadar *SHBG* pada kenyataannya lebih bersifat kompleks. Selain hormon steroid seks, beberapa faktor eksogen dan endogen antara lain seperti usia, jenis kelamin, intake kalori, intake protein, intake serat, keseimbangan energi, faktor-faktor pertumbuhan, genetik dan

hormon-hormon lain serta keadaan patologis, dapat turut terlibat dalam pengaturan kadar *SHBG* plasma (Reed *et al.*,1987; Toscano *et al.*,1992 ; Loukovaara *et al.*,1995; Longcope *et al.*, 2000). Anggapan ini didukung oleh beberapa hasil penelitian yang menunjukkan adanya korelasi negatif antara *SHBG* dengan *BMI* (*Body Mass Index*) dimana pria obesitas atau pria dengan *BMI* tinggi, memiliki kadar *SHBG* yang lebih rendah dibandingkan pria dengan *BMI* normal (Longcope *et al.*,1990; Vermeulen *et al.*,1996). Pada penelitian pria normal yang diberi diet tinggi lemak dilaporkan telah terjadi penurunan kadar *SHBG* sedangkan diet rendah lemak menyebabkan terjadinya peningkatan kadar *SHBG* (Reed *et al.*,1987). Penelitian lain menyebutkan adanya peningkatan kadar *SHBG* pada pria dan wanita *vegetarian* dibandingkan *non vegetarian* (Armstrong *et al.*,1981; Belanger *et al.*,1989; Key *et al.*,1990). Kadar *SHBG* juga dilaporkan telah menunjukkan hubungan positif dengan usia dan *intake* serat sedangkan hubungan negatif ditunjukkan oleh *intake* protein dan lemak hewani (Longcope *et al.*,2000). Selain itu pada beberapa penelitian *in vitro* dengan menggunakan kultur sel *HepG2* (*Human hepatoma cell line*) yang diketahui dapat mensintesis *SHBG*, ditunjukkan bahwa hormon-hormon peptida seperti insulin dan prolaktin serta faktor-faktor pertumbuhan seperti *IGF-1* (*Insulin Like Growth Factor I*), *EGF* (*Epidermal Growth Factor*) dan *TGF- α* (*Transforming Growth Factor Alpha*) secara bermakna menyebabkan penurunan sekresi *SHBG* sedangkan hormon tiroid menyebabkan peningkatan sekresi *SHBG* oleh kultur sel tersebut (Plymate *et al.*,1990; Loukovaara *et al.*,1995). Pada keadaan patologis misalnya pada penderita

hipertiroid, kadar *SHBG* dilaporkan mengalami peningkatan sedangkan pada penderita hipotiroid kadar *SHBG*nya mengalami penurunan (Rosner,1990). Oleh karena itu pengukuran kadar *SHBG* dianggap dapat digunakan untuk pemeriksaan fungsi tiroid seperti yang diperlihatkan dalam suatu penelitian dimana peningkatan kadar *SHBG* telah digunakan sebagai marker dari hipotiroid subklinik (Staub *et al.*,1978). Berkaitan dengan kondisi patologis, kadar *SHBG* juga sering dihubungkan dengan penyakit yang secara khusus disebabkan oleh kelainan aksi dari hormon-hormon steroid seperti *hirsutism* pada wanita dengan kadar *SHBG* yang rendah dan *gynecomastia* pada pria dengan kadar *SHBG* yang tinggi (Anderson,1974). Pengaturan dari masing-masing faktor yang dianggap mempengaruhi kadar *SHBG* tersebut tergantung pada berbagai periode dari siklus kehidupan. Pada pria variasi fisiologis dari kadar *SHBG* diawali dengan peningkatan kadar *SHBG* saat masa kanak-kanak yang dipertahankan stabil hingga awal pubertas. Kadar *SHBG* kemudian menurun secara mencolok pada masa pubertas hingga saat menjelang dewasa dan konstan sampai dekade limapuluhan (Sinnecker,1993 dalam Hampl dan Starka L.,1996; Anderson,1974). Peningkatan kadar *SHBG* pada pria setelah usia limapuluhan ini dihubungkan dengan terjadinya penurunan kadar testosteron total (Vermeulen *et al.*,1972 dalam Anderson,1974) Selanjutnya secara berangsur-angsur akan mengalami peningkatan sampai pertengahan usia 80 an (Sinnecker,1993 dalam Hampl dan Starka.,1996). Pada perempuan penurunan kadar *SHBG* di masa pubertas lebih sedikit dibandingkan laki-laki. Pada saat dewasa, kadar *SHBG* pria hanya

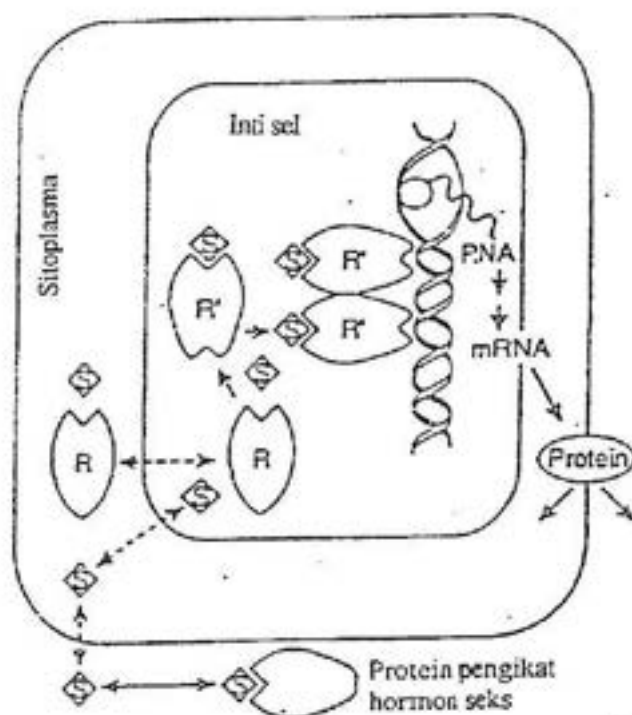
separuh dari kadar *SHBG* wanita. Kadar *SHBG* wanita dipertahankan konstan hingga setelah menopause dimana produksi steroid gonad terutama estradiol sudah mulai menipis (Anderson,1974; Toscano *et al.*,1992). Pada wanita hamil kadar *SHBG* meningkat secara nyata sebesar lima hingga sepuluhkali dibandingkan wanita normal yang tidak sedang hamil (Anderson,1974). Penjelasan yang mungkin terhadap adanya perbedaan kadar *SHBG* antara pria dan wanita adalah karena terdapatnya efek yang berlawanan dari androgen dan estrogen pada saat sintesis *SHBG* di hati. Pada saat prepubertas, produksi hormon testosteron dan estrogen sangat rendah sehingga produksi *SHBG* kemungkinan tidak dipengaruhi oleh hormon-hormon seks namun tampaknya lebih bergantung pada kadar hormon tiroid yang adekuat sebelum masa pubertas. Ketika anak perempuan mengalami masa pubertas terjadi peningkatan produksi estrogen dan androgen adrenal. Keseimbangan peningkatan produksi estrogen dan androgen inilah yang tampaknya menyebabkan penurunan kadar *SHBG* yang relatif lebih sedikit. Sebaliknya pada pria peningkatan produksi testosteron lebih besar dibanding estrogen sehingga kombinasi efek ini menyebabkan penurunan kadar *SHBG* yang lebih besar (Anderson,1974).

Berdasarkan kenyataan bahwa kadar *SHBG* dalam plasma darah manusia memiliki variasi yang besar, penelitian terbaru secara *in vitro* pada sel *HepG2* hepatoblastoma manusia yang memiliki kemampuan memproduksi *SHBG* telah dilakukan untuk menjelaskan variasi kadar *SHBG* dalam kaitannya dengan aktivitas promotor *SHBG* yang difokuskan pada jumlah pengulangan sekuens pentanukleotida

(TAAAA)_n yang terdapat dalam sekuens *alu* pada batas 5' dari promotor *SHBG* manusia (Hogeveen *et al.*,2001). Dari penelitian tersebut diketahui bahwa terdapat variasi yang tinggi jumlah pengulangan (TAAAA)_n dalam sekuens *alu* antar individu dalam populasi umum. Pada populasi umum alel-alel *SHBG* mengandung sedikitnya pengulangan 6-10 TAAAA. Melalui uji *in vitro* pada sel *HepG2* hepatoblastoma manusia diketahui bahwa elemen pengulangan pentanukleotida (TAAAA)_n berpengaruh terhadap aktivitas transkripsi *promotor SHBG*. Aktivitas transkripsi dari konstruksi *promotor SHBG* manusia-reporter *luciferase* sel *HepG2* yang mengandung pengulangan 6 TAAAA ternyata lebih rendah secara bermakna dibandingkan yang mengandung pengulangan 7-10 TAAAA. Perbedaan aktivitas transkripsi ini terjadi karena ulangan (TAAAA)₆ dalam sekuens *alu*, mengandung tempat pengikatan faktor inti (*nuclear factor binding site*) sehingga dapat berikatan dengan suatu 46 kDa *liver enriched nuclear protein* (dari hasil ekstraksi hati tikus), yang kemudian bersama dengan elemen *downstream* (sebagai aktivator transkripsi) menimbulkan efek *silent* transkripsi terhadap aktivitas *promotor SHBG* manusia. Dengan demikian disimpulkan bahwa variasi pengulangan elemen pentanukleotida (TAAAA)_n di dalam sekuens *alu* pada *promotor SHBG* manusia, memiliki efek pada aktivitas transkripsi dari *promotor SHBG* tersebut secara *in vitro* pada sel *HepG2*. Hal ini akan memberikan andil pada perbedaan kadar plasma *SHBG* antar individu serta mempengaruhi masuknya hormon steroid seks ke dalam jaringan targetnya (Hogeveen *et al.*,2001).

II.6. Mekanisme kerja steroid intraseluler dan mekanisme kerja steroid melalui reseptor *SHBG* pada sel target

Hormon steroid dalam sirkulasi terikat terutama pada protein spesifik. Hanya sebagian kecil dari steroid dalam sirkulasi yang berada dalam bentuk bebas. Steroid dalam bentuk bebas ini memiliki kapasitas untuk memasuki sel target secara difusi pasif. Secara umum (teori klasik) dianggap bahwa hanya steroid bebas yang dapat memasuki sel target. Di dalam sel target, steroid terikat pada reseptor spesifik yang terletak di inti sel. Setelah mengikat steroid, reseptor mengalami transformasi atau aktivasi menjadi suatu dimer yang menghasilkan peningkatan afinitas reseptor terhadap sekuens spesifik DNA. Proses berikutnya terjadi transkripsi DNA yang membentuk mRNA. mRNA yang memasuki sitoplasma kemudian mengalami translasi menghasilkan protein spesifik yang selanjutnya akan memberikan respon biologis (Gambar II.6.1) (Griffin dan Ojeda, 1996).



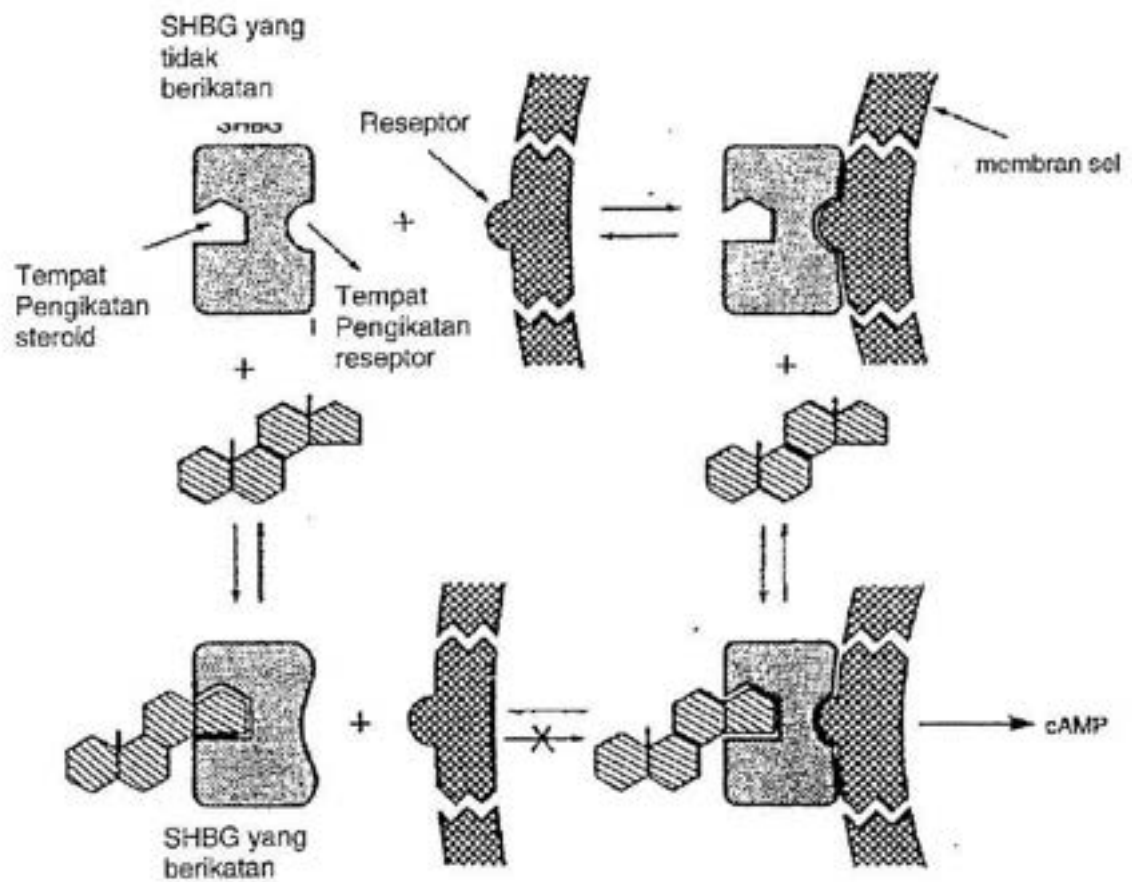
Gambar II.6.1. Skema mekanisme kerja hormon steroid intraseluler. S: steroid, R: reseptor (Griffin dan Ojeda, 1996).

Meskipun secara umum dianggap bahwa protein spesifik (dalam hal ini *SHBG*) yang mengikat hormon steroid (dalam hal ini testosteron) hanya berperan dalam pengaturan kadar steroid (testosteron) bebas dalam plasma, penemuan terbaru tentang adanya reseptor *SHBG* (R_{SHBG}) pada membran sel dari berbagai jaringan, telah memperkuat pertimbangan adanya fungsi tambahan dari *SHBG* (Nakhla *et al.*, 1990). Dari beberapa penelitian telah diperlihatkan bahwa *SHBG* terikat secara spesifik pada R_{SHBG} yang terdapat di membran plasma dari sel-sel prostat manusia (Hyrb *et al.*, 1985), desidua endometrium (Avvakumov *et al.*, 1985) dan testis

manusia (Fraria *et al.*,1994) untuk membentuk suatu kompleks *SHBG-R_{SHBG}* (Nakhla *et al.*,1999). *R_{SHBG}* ini merupakan bagian integral dari sistim transduksi sinyal yang memungkinkan hormon steroid mempengaruhi fungsi sel tanpa ikut masuk ke dalam sel target (Rosner *et al.*,1999). Dengan ditemukannya *R_{SHBG}* yang spesifik pada membran sel dari berbagai jaringan, diyakini bahwa *SHBG* memiliki peran pengaturan yang lebih luas lagi (Hyrb *et al.*,1990). Namun bagaimana hubungan antara model klasik dari mekanisme kerja steroid intraseluler dengan mekanisme kerja steroid yang terbaru melalui sistem Steroid-*SHBG-R_{SHBG}*, hingga kini belum ada penjelasannya lebih lanjut (Nakhla *et al.*,1990).

Model interaksi atau mekanisme kerja terbaru antara steroid, *SHBG* dan *R_{SHBG}* telah diteliti menggunakan *human prostatic cancer cell line (LNCaP)*(Nakhla *et al.*,1990). Model interaksi tersebut dijelaskan terbagi atas dua tahap. Tahap pertama dikatakan bahwa *SHBG* memiliki dua tempat pengikatan yaitu satu tempat pengikatan steroid dan satu lagi tempat pengikatan dengan *R_{SHBG}*. Pengikatan *SHBG* dengan steroid akan menginduksi perubahan *SHBG membran-binding domain* yang menghalangi *SHBG* berikatan dengan membran sel. Dengan demikian *R_{SHBG}* di membran plasma sel target hanya mengikat *SHBG* dalam bentuk bebas (*SHBG* yang tidak berikatan dengan hormon steroid). Pada tahap kedua dari interaksi steroid, *SHBG* dan *R_{SHBG}* dikatakan bahwa setelah *SHBG* bebas terikat pada reseptornya, steroid baru dapat diikat oleh kompleks *SHBG-R_{SHBG}*. Aktivasi kompleks *SHBG-R_{SHBG}* oleh steroid tadi akan mengaktifasi enzim adenilat siklase melalui protein G yang

terdapat di permukaan sebelah dalam membran plasma. Protein G yang telah diaktivasi akan mengkatalis pengubahan *ATP* menjadi siklik *AMP* (*cAMP* atau *cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate*) sehingga terjadi akumulasi atau peningkatan yang cepat dari siklik *AMP* intraseluler yang bertindak sebagai caraka kedua atau perantara kedua intraseluler (*second messenger*) pada jalur transduksi sinyal dalam sel. Selanjutnya siklik *AMP* akan mengaktifkan enzim berikutnya yaitu protein-kinase A (*PKA*) melalui proses fosforilasi yang akan mengontrol terjadinya berbagai proses metabolik dalam sel termasuk diantaranya adalah proses transkripsi gen (Gambar II.6.2) (Hyrb *et al.*,1990; Nakhla *et al.*,1990; Rosner *et al.*,1999; Nakhla *et al.*,1999; Soewoto,2000).



Gambar II.6.2. Model interaksi antara steroid, SHBG dan reseptor SHBG (Rosner *et al.*, 1999).

BAB III

BAHAN DAN CARA KERJA

III.1. Strategi umum

Strategi umum yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

1. Penyiapan sampel serum dengan menggunakan *blue sepharose* untuk menyingkirkan albumin.
2. *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polycrylaide Gel Electrophoresis*) untuk memisahkan protein *SHBG* dari protein-protein lainnya berdasarkan perbedaan berat molekulnya
3. *Western blot* (*immunoblotting*) untuk mendeteksi protein *SHBG* yang sudah terimobilisasi pada suatu membran menggunakan antibodi yang spesifik terhadap protein *SHBG*

III.2. Bahan, alat dan reagensia

III.2.1. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel serum pria Indonesia dewasa sehat. Sebagai bahan kontrol digunakan *SHBG* murni (*Bio Design International, Saco, ME*) dan serum kera (*Macaca fascicularis*).

Penentuan kriteria sehat pada sampel pria Indonesia dewasa adalah jika hasil anamnesis kesehatan, pemeriksaan fisik dan pemeriksaan laboratorium berada dalam

batas-batas normal. Hal ini perlu dilakukan untuk mengatasi berbagai faktor (selain faktor genetik) yang dianggap dapat mempengaruhi kadar *SHBG*.

Teknik pengambilan populasi sampel dalam penelitian ini dilakukan dengan cara *purposive sampling* (Sudjana, 1975). Populasi pria Indonesia dewasa sehat yang dipilih untuk penelitian ini berasal dari kelompok sosial ekonomi rendah yang dalam hal ini diwakili oleh pegawai negeri golongan I di Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (FKUI) dan di Institut Pertanian Bogor (fakultas pertanian, perikanan, kehutanan dan teknologi pertanian). Berdasarkan data dari anggota tim peneliti *SHBG* lainnya (*personal communication*), diketahui bahwa hasil perhitungan *Body Mass Index (BMI)* dan analisa gizi pada populasi pria Indonesia dewasa sehat dari kelompok sosial ekonomi rendah ini boleh dikatakan cukup homogen. Jumlah sampel yang diteliti adalah 18 orang berusia antara 30-47 tahun.

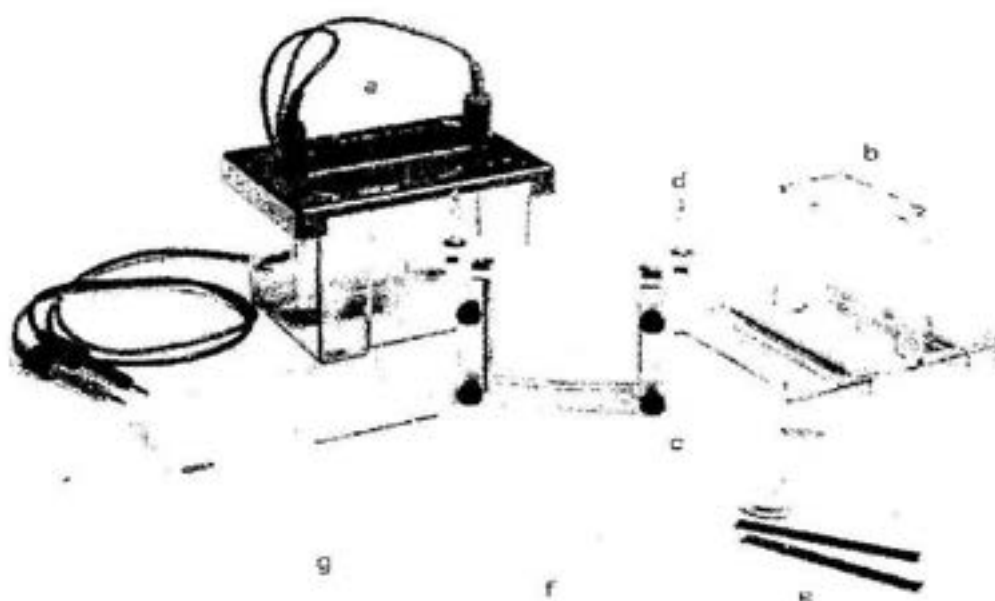
Sebelum pengambilan sampel, diberikan penjelasan tentang kriteria responden yang dipilih, latar belakang dan tujuan penelitian, perlakuan serta hak dan kewajiban responden. Surat persetujuan (*informed consent*) ditandatangani oleh responden yang bersedia ikut dalam penelitian. Penelitian ini telah lolos kaji etik yang dilakukan oleh Panitia Etik Penelitian FKUI.

Penyaringan responden yang berhak ikut dalam penelitian, dilakukan oleh anggota tim peneliti *SHBG* FKUI dengan cara melakukan anamnesa kesehatan, pemeriksaan fisik, penilaian status gizi, serta evaluasi keadaan sosial ekonomi.

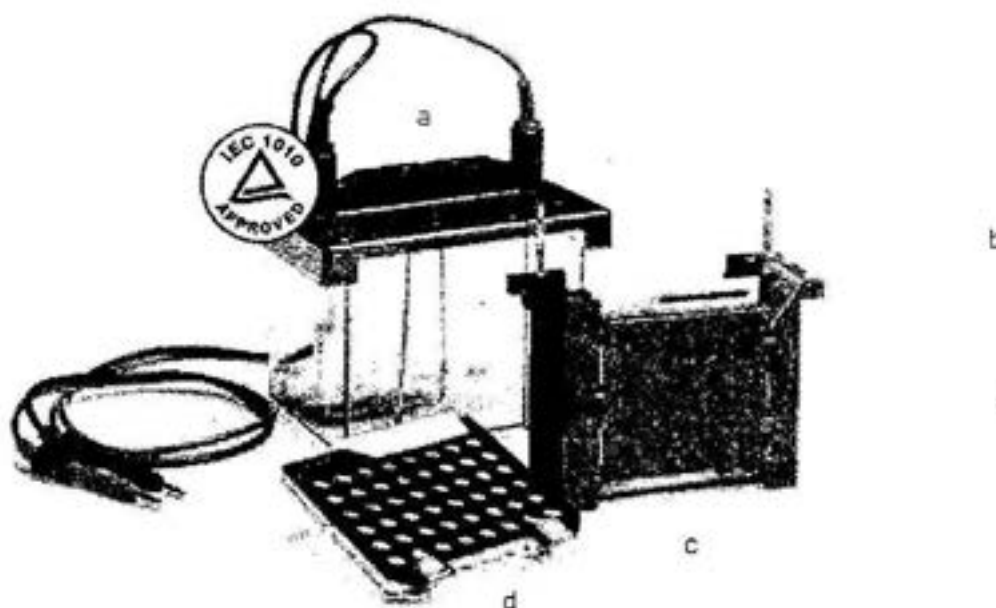
Mengingat penelitian ini merupakan penelitian gabungan tentang status gizi dan variasi fenotip *SHBG* yang tergabung dalam proyek *URGE (University Research for Graduate Education)* maka penyaringan responden, pengumpulan data-data responden dan sebagian pemeriksaan laboratorium dikerjakan secara bersama-sama sesuai tahap kerja dan jadwal waktu yang telah ditentukan. Selanjutnya masing-masing anggota tim peneliti bertanggung jawab penuh atas topik atau sub penelitian yang menjadi bagiannya masing-masing.

III.2.2. Alat

Rincian alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 2. Alat khusus yang digunakan adalah *Mini protean electrophoresis cell*, *Biorad*, (Gambar III.1) untuk *SDS-PAGE* dan *Mini trans-blot electrophoretic transfer cell*, *Biorad* (Gambar III.2) untuk *Western blot*.



Gambar III.1. *Mini protean electrophoresis cell, lower buffer chamber and lid (a), casting stand (b), sandwich clamp assemblies (c), inner cooling core (d), spacers (e), glass plate (f) dan comb (g) (Life Science research product Biorad ,1997)*



Gambar III.2. *Mini trans blot electrophoresis transfer cell, lower buffer chamber, and lid (a), ice cooling (b), electrode modul (c), gel cassette holder (d). (Biorad)*

III.2.3. Reagensia

Rincian reagensia yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 2.

III.3. Cara Kerja

III.3.1. Penyiapan sampel serum

Responden yang memenuhi syarat-syarat untuk penelitian diminta untuk melakukan puasa mulai pukul 22.00 sampai saat pengambilan sampel, kira-kira

pukul 08.00. Pada tiap responden dilakukan pengambilan sampel darah vena sebanyak 10 ml oleh petugas laboratorium Biologi FKUI Jakarta. Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung kaca steril yang disimpan dalam kotak es selama perjalanan ke Laboratorium Biologi FKUI Jakarta. Setibanya di Laboratorium Biologi FKUI, sampel darah disentrifugasi dengan kecepatan 2500-3000 rpm selama 20 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi sampel darah, dialiquot dalam tiga buah tabung *eppendorf* dan disimpan pada suhu -20°C sebelum dilakukan pemeriksaan di laboratorium.

Penyingkiran atau penghilangan albumin dari serum dilakukan dengan menggunakan *blue sepharose* (Pharmacia) sesuai dengan metode yang digunakan oleh Cornelisse et al., 1994. Dua puluh mikroliter dari masing-masing sampel diencerkan 1:5 (v/v) di dalam larutan *buffer* sampel yaitu 0,05 mol/l Tris-HCL dan 0,1 mol/l KCL (pH 7.0). Sampel yang telah diencerkan ini dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* yang sudah berisi 100 μl gel *blue sepharose*. Setelah disentrifugasi perlahan (600 rpm) selama 30 menit, 8 μl supernatan diambil untuk elektroforesis. Pembuatan 100 μl gel *blue sepharose* yang telah disebutkan diatas, dilakukan dengan mengaduk bubuk *blue sepharose* dan *aquadest* (sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan) pada *sintered glass filtered* sambil menyalakan pompa penyedot hampa udara agar dapat masuk ke dalam tabung labu *erlenmeyer* yang terletak dibawahnya. Endapan gel *blue sepharose* yang terbentuk pada dasar tabung labu *erlenmeyer* lalu dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* dengan menggunakan pipet transfer.

Sebelum *sintered glass filter* digunakan, dapat dibersihkan(dibilas) terlebih dahulu dengan menggunakan larutan *potassium permanganat* dan H_2O_2 30% secara berurutan.

III.3.2. Teknik *SDS PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)*

Teknik ini dilakukan untuk memisahkan protein dalam hal ini protein *SHBG* dari protein-protein lain dalam serum, berdasarkan perbedaan berat molekulnya. Cara kerja teknik *SDS PAGE* ini dilakukan sesuai buku petunjuk *Mini-Protean II Dual Slab Cell (Biorad)*. Pada penelitian ini serum sudah dibebaskan dari albumin melalui penggunaan *Blue sepharose*. Penggunaan bahan *SDS* sebagai detergent yang bermuatan negatif, akan menyebabkan denaturasi *SHBG* menjadi beberapa sub unit. Teknik *SDS PAGE* ini memerlukan dua lapis gel yang terdiri dari gel pemisah (*separating gel*) dan gel penumpuk (*stacking gel*). Komposisi kedua gel tersebut dapat dilihat pada tabel III.1. Gel pemisah yang digunakan dalam penelitian ini memiliki konsentrasi sebesar 10%.

TABEL III.1.

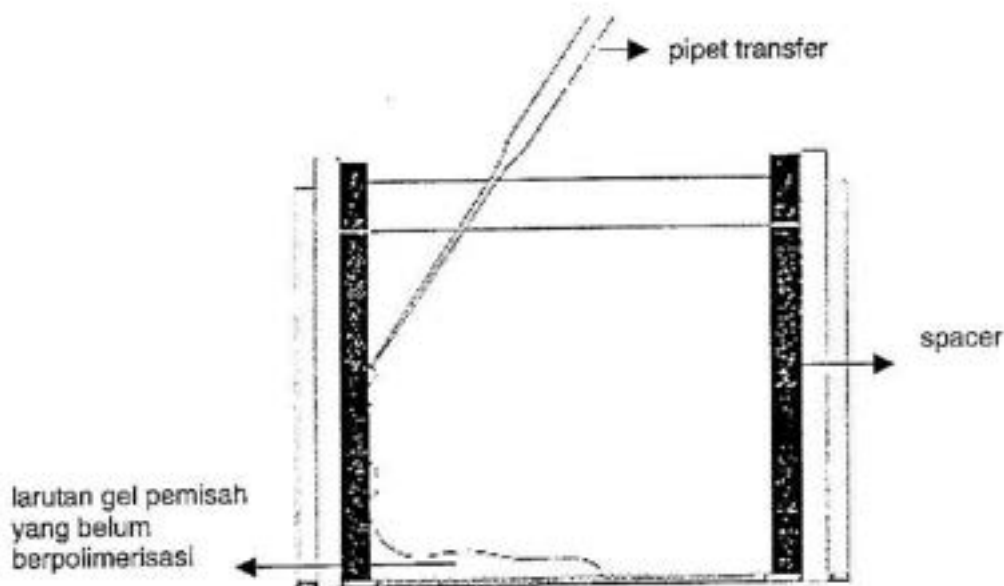
KOMPOSISI LARUTAN GEL PEMISAH DAN GEL PENUMPUK

	Gel Pemisah 10%	Gel penumpuk
<i>Aquabidest</i>	4,012 ml	6,1 ml
1,5 M Tris-Hcl, pH 8,8	2,5 ml	-
0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	-	2,5 ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l
<i>Acrylamide/Bis</i> (30%)	3,3333 ml	1,3 ml
<i>Ammonium persulfate</i> 10%	65 μ l	50 μ l
<i>TEMED</i>	6,5 μ l	10 μ l

Tahap pertama yang dilakukan dalam teknik ini adalah menyiapkan tempat pembuatan lapisan gel dengan menumpukkan *glass plate* bagian dalam dan luar serta meletakkan *spacer* diantara tepi kanan dan kiri dari tumpukan *glass plate* tadi. Tumpukan *glass plate* dengan permukaan tepi bawah yang telah rata kemudian dirakitkan ke *sandwich clamp assemblies* dan dipasang pada *casting stand*

Sisir (*comb*) ditempatkan dengan benar pada tempat pembuatan lapisan gel (diantara tumpukan *glass plate*) untuk menandai batas pengisian larutan gel pemisah yang belum berpolimerisasi. Dengan menggunakan spidol, tanda batas tersebut dibuat pada *glass plate* berjarak 1 cm di bawah gigi sisir. Sisir kemudian diangkat. Dengan bantuan pipet transfer, campuran reagensia untuk membuat gel pemisah konsentrasi 10% yang belum berpolimerisasi (lihat tabel III.1) dimasukkan ke dalam

tempat pembuatan gel sampai tanda batas yang telah dibuat sebelumnya. Hal ini dilakukan secara perlahan sepanjang tepi dari salah satu *spacer* (Gambar III.3). Bagian atas larutan gel pemisah kemudian dilapisi dengan *aquabidest*. Gel pemisah didiamkan selama 1 jam agar berpolimerisasi pada suhu kamar.

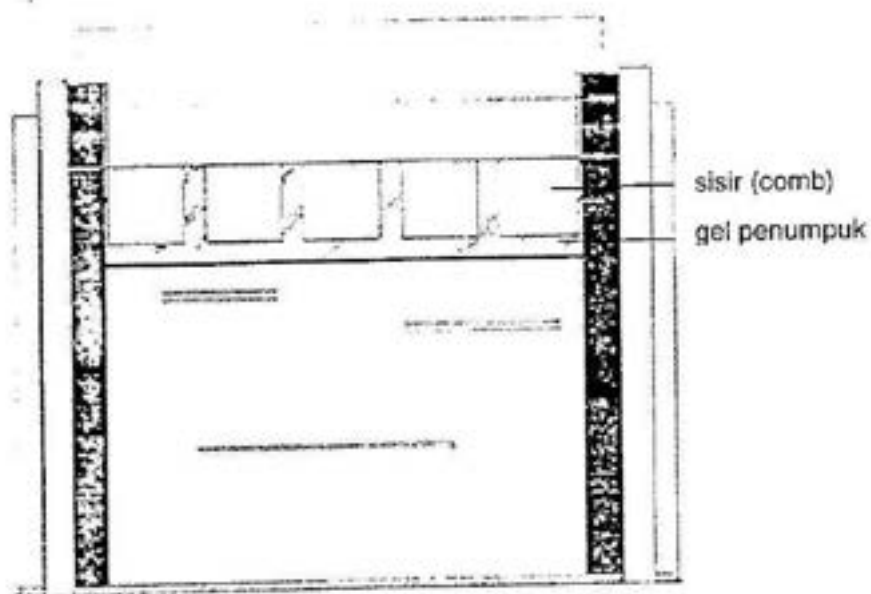


Gambar III.3. Memasukkan gel pemisah ke dalam celah di antara tumpukan *glass plate* (pada tempat pembuatan lapisan gel) (Bollag, 1991)

Setelah gel pemisah berpolimerisasi, lapisan *aquadest* di atasnya dibuang. Campuran reagensia untuk membuat larutan gel penumpuk (Tabel III.1) lalu diisi ke atas permukaan lapisan gel penumpuk yang telah berpolimerisasi dengan bantuan pipet transfer. Sisir diletakkan ke dalam larutan

gel penumpuk hingga bagian pangkal gigi sisir sejajar tepi atas *glass plate*.

Gel penumpuk didiamkan selama 45 menit agar berpolimerisasi pada suhu kamar (Gambar III.4.)



Gambar III.4. Gel penumpuk mulai berpolimerisasi (Bollag,1991)

Setelah gel penumpuk berpolimerisasi, sisir diangkat dari tempatnya. "Sumur" yang telah terbentuk dari hasil cetakan gigi sisir lalu dibilas dengan *aquadest*

dan dikeringkan dengan menyerap *aquadest* tersebut menggunakan *tissue*. *Sandwich clamp assemblies* kemudian dilepaskan dari *casting stand* dan dipasang ke *inner cooling core* untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam *lower buffer chamber*.

Ke dalam *lower buffer chamber* dimasukkan 400ml dapar elektroda (*running buffer*) dengan mencampur 80 ml stok dapar elektroda (Tabel III.2) dengan 320 ml *aquadest*. Gelembung udara yang terbentuk dibawah gel, dihilangkan dengan jarum suntik, agar kontak elektrik dapat dicapai dengan baik.

TABEL III.2.

**KOMPOSISI LARUTAN 5x DAPAR ELEKTRODA
(RUNNING BUFFER) pH 8,3**

<i>Tris base</i>	15 g/l
<i>Glycine</i>	72 g/l
<i>SDS</i>	5 g/l
Tambahkan <i>aquabidest</i> sampai	1000 ml

Masing-masing sampel serum disiapkan dengan mencampur 8 μ l sampel serum ke dalam tabung eppendorf yang berisi 8 μ l larutan stok dapar sampel (*buffer sample*) (Tabel III.3) lalu dipanaskan di air mendidih (100 °C) selama 2 menit dan di pusing (*spin*) dengan mesin *sentrifuge* selama 3 detik.

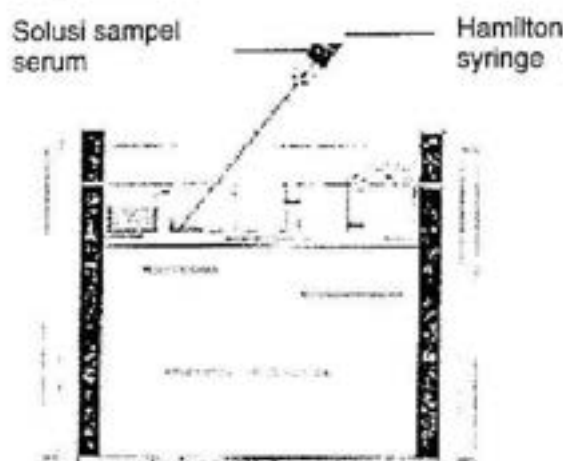
TABEL III.3.
KOMPOSISI LARUTAN DAPAR SAMPEL
(SAMPLE BUFFER)

<i>Aquabidest</i>	4 ml
0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	1 ml
Glycerol	0,80 ml
SDS 10%	1,6 ml
<i>2-b-mercaptoethanol</i>	0,4 ml
<i>Bromophenol blue</i> 0,05%	0,2 ml

Sebanyak 5 μ l larutan dari campuran tadi lalu dimasukkan (*loading*) ke dalam sumur dengan menggunakan semprit Hamilton. Hal yang sama juga dilakukan untuk menyiapkan kontrol (serum *Macaca fascicularis* dan *SHBG* murni). Untuk kontrol *SHBG* murni, sebelum dicampur dengan dapar sampel, terlebih dahulu dicampur dengan larutan dapar *SHBG* (0,05 M Tris-HCL pH 7,2). Ke dalam sumur lainnya kemudian dimasukkan 5 μ l *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standarts*, (*Biorad*) (Gambar III.5).

Setelah sampel serum, kontrol dan *SDS PAGE molecular weight standarts low range* dimasukkan ke dalam sumur, penutup ditempatkan di atas *lower buffer chamber*. Warna steker pada penutup harus sama dengan stop kontak pada *inner cooling core*. Pemasok daya dihidupkan dan tegangan listrik diatur konstan sebesar 150 Volt. Proses elektroforesis berlangsung selama 45 menit.

Setelah elektroforesis lengkap, pemasok daya dimatikan. Penutup dibuka dan *sandwich clamp assembly* dilepaskan dari *inner cooling core*. *Glass plate* dibuka secara hati-hati untuk mengeluarkan gel. Salah satu ujung atas gel dipotong sedikit sebagai tanda untuk orientasi lajur sumur. Selanjutnya gel siap ditransfer ke membran melalui teknik *Western blot*.



Gambar III.5. *Loading* larutan protein ke dalam sumur sampel (Bollag,1991)

III.3.3. Teknik Western blot

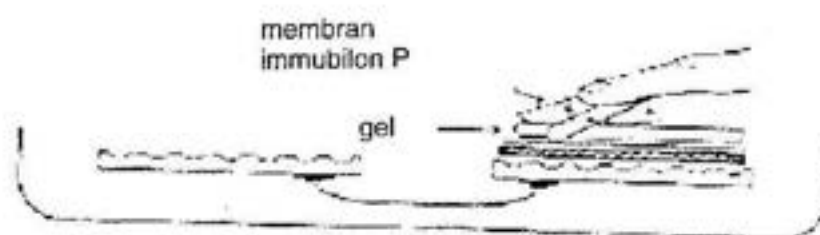
Teknik imunokimia yang dikenal dengan istilah *immunoblotting* atau *Western blot* ini digunakan untuk mendeteksi protein yang sudah terimobilisasi dalam hal ini protein *SHBG* yang selanjutnya direaksikan dengan antibodi spesifik terhadap *SHBG* pada suatu membran. *Western blotting* dapat dibagi dalam dua tahap utama yaitu

transfer protein dari gel ke matriks (membran) dan deteksi epitop dengan antibodi spesifik. Pada penelitian ini protein pada gel hasil elektroforesis ditransfer ke membran Immobilon-P (*Sigma Millipore Corp., Bedford, MA, cat.no.P-2438*), sesuai buku petunjuk *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)*. Urutan kerja teknik Western blot secara rinci adalah sebagai berikut :

Membran *Immobilon-P* dan *filter paper (Biorad, cat.no.170-3932)* digunting sesuai dengan ukuran gel. Membran ditandai dengan pensil sesuai pola lajur sumur, untuk identifikasi gel dan orientasi membran. Membran lalu direndam dalam metanol 100% selama 15 detik dan direndam dalam *aquabidest* selama 5 menit. Larutan dapar transfer (*transfer buffer*) dibuat dengan mencampur 25mM Tris pH 8,3 dan 192 mM *glycine* serta metanol 20% yang kemudian disimpan dalam lemari es. Pada saat mulai transfer, larutan dapar transfer sebaiknya berada dalam keadaan suhu 4° C. Membran, gel hasil elektroforesis, *filter paper* dan *fiber pads* direndam dalam larutan dapar transfer selama 15-30 menit sambil digoyang (*shaker*) menggunakan *waterbath shaker (Elmeco, model WB-20)* pada suhu ruang.

Gel cassette holder diletakkan dalam posisi terbuka dengan bagian panel bening (sisi anoda) berada diatas/diluar dan panel abu-abu (sisi katoda) berada di bawah/di dalam rendaman larutan dapar sampel pada wadah *pyrex*. Susunan *sandwich* dalam *gel cassette holder* diatur secara berurutan mulai dari bawah (panel abu-abu) ke atas (panel bening) sebagai berikut : *fiber pad, filter paper, gel hasil elektroforesis, membran Immobilon-P, filter paper, fiber pad*.

Untuk menghindari terbentuknya gelembung udara, bagian permukaan dari tiap lapisan *sandwich* ditekan dengan tabung reaksi yang dijalankan mengelilingi (Gambar III.6).



Gambar III.6. Menghilangkan gelembung udara dengan tabung reaksi (Bollag, 1991).

Setelah susunan *sandwich* rapi, *gel cassette holder* ditutup dan dikunci lalu dimasukkan ke dalam *electrode modul* dengan posisi panel abu-abu menghadap ke dinding/sisi hitam (katoda) dari *electrode modul*. *Electrode modul* yang telah berisi *gel cassette holder* tadi serta *magnetic bar*, larutan dapar sampel (suhu 4° C) dan *ice cooling unit* (berisi *aquabidest* beku dari *freezer*), dimasukkan ke dalam *buffer chamber*. Penutup dipasang di atas *buffer chamber* dan pemasok daya dihidupkan untuk memulai proses elektrotransfer selama 1 jam pada tegangan konstan 100 Volt.

Setelah elektrotransfer selesai, *gel cassette holder* dibuka dan gel diambil. Membran *Immobilon-P* digunting pada lokasi lajur sumur yang *diloaded* dengan *SDS PAGE Molecular Weight Standart* untuk nantinya diwarnai dengan *Amido black 10-B* (0,1% *Amido black 10-B*, 25% *metanol*, 10% *Acetic acid*). Pewarnaan

dilakukan dalam wadah kotak plastik selama 5 menit sambil digoyang (*shaker*) di *waterbath shaker* pada suhu kamar. *Destaining Amido black* dilakukan dengan larutan yang mengandung 90% Metanol, 2% *Acetic acid* dan 8% aquabides lalu dikeringkan. Sisa potongan membran *Immobilon-P* lainnya yaitu lajur sumur yang *diloaded* dengan serum sampel dan kontrol, dimasukkan ke dalam wadah kotak plastik yang berisi larutan *blocking* yang terdiri dari 40 gr/L BSA, 0,5 gr/L *Tween 20*, 0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl. Membran *Immobilon-P* dalam larutan penghalang kemudian disimpan di lemari es bersuhu 4°C selama satu malam.

Gel dimasukkan dalam wadah kotak plastik dan diwarnai dengan *Commassie blue R-250* (25mM Tris, 192 mM *glycine* dan 10% metanol) sambil *dishaker* di *waterbath shaker* selama 30 menit pada suhu kamar. Kemudian gel dimasukkan dalam wadah kotak plastik berisi larutan *destaining commassie blue* (40% metanol, 10% *acetic acid*) sambil *dishaker* di *waterbath shaker* selama 90 menit pada suhu kamar.

Keesokan harinya potongan membran *Immobilon-P* di rendaman larutan penghalang dipindahkan ke wadah kotak plastik baru untuk diinkubasi dengan larutan antibodi I (*polyclonal rabbit anti-human SHBG*)(A350) yang dilarutkan dengan perbandingan 1 : 500 dalam TBS (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl). Inkubasi dilakukan selama 2 jam sambil *dishaker* di *waterbath shaker* pada suhu kamar. Potongan membran *Immobilon-P* kemudian dicuci tiga kali (tiap kali cuci selama 5 menit) dengan larutan TBS (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L

NaCl) sebanyak 40 ml untuk tiap kali cuci sambil *dishaker* di *waterbath shaker* pada suhu kamar. Selanjutnya potongan membran *Immobilon-P* dipindahkan ke wadah kotak plastik baru untuk diinkubasi dengan larutan antibodi II (*polyclonal goat anti rabbit Ig*, terkonjugasi dengan *alkaline phosphatase*) yang dilarutkan dengan perbandingan 1 : 150 dalam *TBS* (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl). Inkubasi dilakukan selama 3 jam sambil *dishaker* di *waterbath shaker* pada suhu kamar.

Setelah diinkubasi dengan antibodi II, potongan membran *Immobilon-P* dicuci secara berurutan dengan larutan *TBS* (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl), *TBS* (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl) + Triton X-100 dan *TBS* (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L NaCl) masing-masing sebanyak 40 ml selama 5 menit sambil *dishaker* di *waterbath shaker* pada suhu kamar.

Visualisasi membran *Immobilon-P* dilakukan dalam wadah kotak plastik berisi larutan 5 ml *alkaline phosphatase buffer* (0,1 mol/L Tris pH 9,5; 0,1 mol/L NaCl dan 0,005 mol/L $MgCl_2$) + 33 μ l *NBT* (*Nitro Blue Tetrazolium*) + 16,5 μ l *BCIP* (*5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl-Phosphate*). Wadah kotak plastik untuk visualisasi membran dibungkus rapat dengan *aluminium foil* dan didiamkan selama 30 menit agar terjadi reaksi lengkap.

Reaksi visualisasi dihentikan dengan mencuci membran *Immobilon-P* (tiga kali tiap 5 menit) dalam wadah kotak plastik yang berisi larutan *EDTA* (*Ethylenediaminetetra acetic acid* + *TBS* (0,05 mol/L Tris pH 8.0 dan 0,15 mol/L

NaCl) sebanyak 40 ml untuk tiap kali pencucian sambil di *shaker* di *waterbath shaker* pada suhu kamar.

Setelah membran Immobilon-P kering, hasil visualisasi didokumentasi dengan cara *scanning* menggunakan komputer.

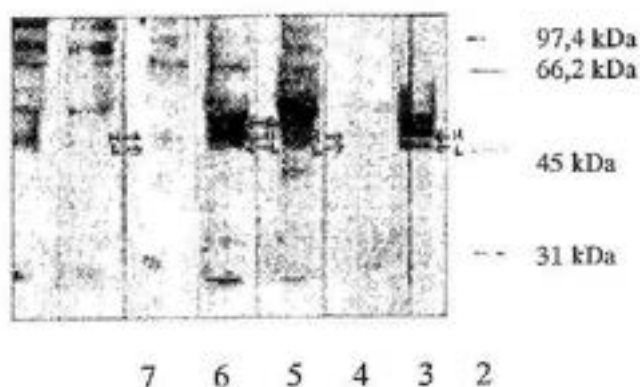
BAB IV

HASIL PENELITIAN

Dari 18 sampel serum pria Indonesia dewasa sehat yang telah dideteksi dengan teknik *SDS PAGE* dan *Western blot* dalam penelitian ini, didapatkan adanya gambaran dua jenis pola fenotip *SHBG* dengan berat molekul yang berbeda. Jenis pola fenotip *SHBG* pertama yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah fenotip *SHBG* dengan dua pita. Fenotip *SHBG* dua pita ini terdiri dari sub unit *heavy* dengan perkiraan berat molekul 51 kDa dan sub unit *light* dengan perkiraan berat molekul sebesar 46 kDa. Gambaran sub unit *heavy* terlihat lebih tebal dibandingkan sub unit *light*. Jenis pola fenotip *SHBG* kedua yang dihasilkan dalam penelitian ini adalah fenotip *SHBG* dengan tiga pita yang memiliki tambahan sub unit ketiga sebagai sub unit *super heavy* dengan perkiraan berat molekul sebesar 56 kDa.

Sedangkan pada kontrol *SHBG* murni dan *SHBG* serum kera (*Macaca fascicularis*) yang disertakan dalam penelitian ini, memperlihatkan gambaran pola fenotip *SHBG* yang terdiri dari dua pita dengan perkiraan berat molekul sub unit *heavy* dan sub unit *light* masing-masing sebesar 51 kDa dan 46 kDa. Gambaran sub unit *heavy* dari kontrol *SHBG* murni dan *SHBG* dari serum kera ini juga menunjukkan penampakan yang lebih tebal jika dibandingkan dengan sub unit *light*. Contoh gambaran pola fenotip *SHBG* dari serum sampel dan kontrol *SHBG* murni serta *SHBG* serum kera

yang disertai dengan *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart* dari hasil *Western blot* dalam penelitian ini dapat dilihat pada gambar IV.1.



Gambar IV.1. Contoh gambaran pola fenotip *SHBG* dari sampel serum dan kontrol *SHBG* murni serta *SHBG* serum kera dari hasil *Western blot*. *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart* (2), *SHBG* serum kera (3), kontrol *SHBG* murni (4), sampel serum fenotip *SHBG* tiga pita(6), sampel serum fenotip *SHBG* dua pita(7).

Keterangan :

L : sub unit *light*

H : sub unit *heavy*

SH : sub unit *super heavy*

Sedangkan hasil perhitungan perkiraan berat molekul dengan menggunakan kurva standar dari *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart*, untuk masing-masing sub unit *SHBG* pada contoh gambaran pola fenotip *SHBG* dari sampel serum dan kontrol *SHBG* murni serta *SHBG* serum kera dapat dilihat pada tabel IV.1. Perhitungan lebih rinci berdasarkan penentuan mobilitas relatif (*Rf*) dari *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart* untuk mencari perkiraan berat molekul

masing-masing sub unit *SHBG* dari contoh gambaran pola fenotip di atas, dapat dilihat pada lampiran 5.

TABEL IV.1.

**HASIL PERHITUNGAN PERKIRAAN BERAT MOLEKUL
MASING-MASING SUB UNIT *SHBG***

Serum	Perkiraan Berat Molekul (kDa) sub unit <i>SHBG</i>			Jumlah pita <i>SHBG</i>
	H	L	SH	
Sampel	51	46	56	2 dan 3
<i>SHBG</i> murni	51	46		2
<i>M. fascicularis</i>	51	46		2

Keterangan : H= *Heavy*, L= *Light*, SH= *Super Heavy*

Perkiraan berat molekul masing-masing sub unit *SHBG* dari masing-masing jenis pola fenotip *SHBG* pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan kurva standar *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart* (Biorad). Mula-mula dihitung mobilitas relatif (*relative mobility* atau *Rf*) dan logaritma dari berat molekul protein penanda. Pada penelitian ini *Rf* merupakan hasil perbandingan antara jarak tempuh/migrasi setiap pita protein (cm) dengan jarak tempuh/migrasi pita terwarnai (*dye*) yang terjauh (batas akhir). Hasil perhitungan *Rf* dan logaritma dari berat molekul protein penanda kemudian digunakan untuk membuat kurva standar berat molekul protein penanda. Setelah itu *Rf* dari masing-masing pita sub unit *SHBG*

pada sampel serum maupun pada kontrol *SHBG* murni dan *SHBG serum kera* lalu dihitung. Perkiraan berat molekul masing-masing sub unit *SHBG* selanjutnya dihitung dengan menggunakan persamaan garis kurva standar berat molekul protein penanda. Hasil perhitungan perkiraan berat molekul masing-masing sub unit *SHBG* sampel serum kemudian dibandingkan dengan perkiraan berat molekul masing-masing sub unit dari kontrol *SHBG* murni dan *SHBG* serum kera.

Hasil perhitungan kadar *SHBG* dari 18 sampel serum yang diperiksa dengan teknik *IRMA (immunoradiometric assay)* diperoleh dari data anggota tim peneliti *SHBG* lainnya atas seijin penelitiannya (dapat dilihat selengkapnya pada bab pembahasan)

Dari keseluruhan sampel serum yang diperiksa pada penelitian ini, pemunculan pola fenotip *SHBG* dua pita terdapat sebanyak 11 sampel serum memiliki nilai rata-rata kadar *SHBG* sebesar 42,24 nmol/L. Sedangkan pola fenotip *SHBG* tiga pita terdapat sebanyak 7 sampel serum dengan nilai rata-rata kadar *SHBG* sebesar 39,44 nmol/L (Tabel IV.2)

TABEL IV.2.

HASIL PERHITUNGAN JUMLAH PITA *SHBG* DAN RATA-RATA KADAR *SHBG* PADA POPULASI PRIA INDONESIA DEWASA SEHAT

Jumlah pita <i>SHBG</i>	Jumlah sampel	Persentase (%)	Rata-rata kadar <i>SHBG</i> (nmol/l)
2	11	61	42,24
3	7	39	39,44

Data yang diperoleh dalam penelitian ini selanjutnya dianalisa secara statistik menggunakan program komputer *SPSS (Statistical Product and Service Solution)* versi 10. Hasil analisa statistik tersebut menunjukkan bahwa nilai t tidak bermakna pada tingkat signifiukan 5% ($t = 0,343$ dengan $P = 0,736$, *2-tail test*) (Lihat lampiran 3).

BAB V

PEMBAHASAN

Protein *SHBG* yang diamati dan dideteksi dari hasil *Western blot* pada penelitian ini merupakan bentuk ekspresi gen. Penentuan pola fenotip *SHBG* dalam penelitian ini ditentukan dengan melihat jumlah pita *SHBG* pada hasil pemeriksaan *Western blot*. Sesuai dengan hasil penelitian Gershagen *et al* (1987) dan Cousin *et al* (1998), terlihat adanya dua macam pola fenotip *SHBG* yaitu fenotip *SHBG* dua pita yang merupakan *SHBG* normal dan fenotip *SHBG* tiga pita yang merupakan *SHBG* varian.

Pemunculan gambaran sub unit *SHBG* yang konstan dengan berat molekul tertentu pada membran Immobilon-P dari hasil *Western blot* dalam penelitian ini menunjukkan adanya reaksi antigen-antibodi yang spesifik untuk *SHBG*. Berdasarkan hasil perhitungan perkiraan berat molekul menggunakan kurva standar *SDS PAGE Low Range Molecular Weight Standart*, pola fenotip *SHBG* dua pita dalam penelitian ini memiliki perkiraan berat molekul sub unit *heavy* yang lebih besar yaitu 51 kDa dibandingkan sub unit *light* yaitu 46 kDa. Berat molekul ini sesuai dengan kontrol *SHBG* murni yang juga selalu muncul dengan gambaran sub unit *light* yang memiliki berat molekul 46 kDa dan sub unit *heavy* yang memiliki berat molekul 51 kDa. Untuk memperkuat dugaan bahwa hasil yang didapat adalah benar sub unit *SHBG* maka digunakan pula kontrol serum dari kera

(*Macaca fascicularis*) yang ternyata menunjukkan gambaran jumlah pita dan perkiraan berat molekul sub unit *SHBG* yang mirip dengan kontrol *SHBG* murni (lihat tabel IV.1). Deteksi molekul *SHBG* kera dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan antibodi poliklonal terhadap *SHBG* manusia. Hal ini dapat dibenarkan karena kera memiliki karakteristik *SHBG* yang hampir sama dengan *SHBG* manusia dan *SHBG* serum kera telah diketahui dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal terhadap *SHBG* manusia (Turner *et al.*, 1994).

Pola fenotip *SHBG* tiga pita dalam penelitian ini memiliki perkiraan berat molekul yang sama dengan pola fenotip *SHBG* dua pita untuk sub unit *heavy* dan sub unit *light*-nya. Yang berbeda adalah terdapatnya sub unit ketiga sebagai sub unit *super heavy* dengan perkiraan berat molekul sebesar 56 kDa pada pola fenotip *SHBG* tiga pita (lihat tabel IV.1). Pemunculan berat molekul sub unit *super heavy* ini sesuai dengan hasil penelitian Power *et al* (1992) yang menyatakan bahwa sub unit *super heavy* memiliki berat molekul yang lebih besar (56 kDa) dibandingkan sub unit *heavy* (52 kDa) dan sub unit *light* (48 kDa). Perbedaan berat molekul yang lebih besar pada sub unit *super heavy* tersebut diduga karena adanya struktur rantai karbohidrat yang lebih kompleks dimana terdapat penambahan tempat konsensus N-Linked oligosakarida pada posisi asparagin 327 dari polipeptida *SHBG*. Menurut Cousin *et al* (1998) keadaan ini merupakan akibat dari adanya mutasi titik di ekson 8 dari gen *SHBG* yang menyebabkan substitusi satu basa pada kodon 327 dari GAC menjadi AAC yang mengkode substitusi asam amino aspartat menjadi asparagin

pada posisi 327 dari polipeptida *SHBG*. Disamping menampakkan adanya produk alel normal *SHBG* pada pemunculan sub unit *heavy* dan sub unit *light*, pemunculan sub unit *super heavy* dalam penelitian ini menunjukkan terdapatnya produk alel varian *SHBG*. Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Baelen *et al* (1992) yang menunjukkan bahwa *SHBG* manusia dikode oleh dua alel autosom yaitu alel normal dan alel varian. Dengan demikian hipotesa pertama pada penelitian ini yang menyatakan bahwa terdapat variasi fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat, telah terbukti benar (hipotesa diterima).

Perbedaan berat molekul antara sub unit *heavy* yaitu 51 kDa dengan sub unit *light* yaitu 46 kDa pada fenotip *SHBG* dua pita dalam penelitian ini tidak mempengaruhi anggapan *SHBG* sebagai glikoprotein homodimer.

Sebagai glikoprotein homodimer, kedua sub unit pada fenotip *SHBG* dua pita tersebut dianggap identik dalam hal polipeptidanya, walaupun memiliki perbedaan berat pada masing-masing sub unitnya. Anggapan tersebut juga diperkuat oleh hasil penelitian secara imunokimia yang menunjukkan terdapatnya beberapa epitop yang sama pada masing-masing sub unit *SHBG* (Hammond *et al.*,1986). Perbedaan berat molekul antara sub unit dari pola fenotip *SHBG* dua pita maupun tiga pita yang terdapat dalam penelitian ini kemungkinan disebabkan karena perbedaan proses glikosilasi yang dialami oleh masing-masing sub unit *SHBG* tersebut (Danzo *et al.*,1989). Sesuai dengan penelitian deglikosilasi enzimatis oleh Danzo *et al* (1989), sub unit *heavy SHBG* yang muncul dengan berat molekul yang lebih besar (51 kDa)

pada penelitian ini kemungkinan mengalami proses glikosilasi yang lebih banyak (memiliki dua rantai *N-linked* oligosakarida) dibandingkan sub unit *light SHBG* dengan berat molekul 46 kDa (hanya memiliki satu rantai *N-linked* oligosakarida). Namun mekanisme yang mengatur proses glikosilasi yang berbeda antara sub unit *heavy* dan *light SHBG* sebagai komponen penyusun dimer *SHBG* tersebut masih belum jelas.

Perbedaan ketebalan pita yang tampak pada sub unit *heavy* dibandingkan sub unit *light* untuk pola fenotip *SHBG* dua pita maupun pola fenotip *SHBG* tiga pita dalam penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian yang didapat oleh Gershagen *et al* (1987). Perbedaan ketebalan tersebut diduga disebabkan karena perbandingan banyaknya sub unit *heavy* adalah 10:1 terhadap sub unit *light*.

Dari 18 sampel serum pria Indonesia dewasa sehat yang dideteksi dalam penelitian ini, 11 sampel serum (61%) menunjukkan gambaran fenotip *SHBG* dua pita sebagai *SHBG* normal. Sedangkan sisanya sebanyak 7 sampel serum (39%) menunjukkan gambaran fenotip *SHBG* tiga pita sebagai *SHBG* varian (Tabel IV.2). Sayangnya frekwensi alel dalam penelitian ini tidak dapat dihitung karena gambaran sub unit *SHBG* dari hasil *Western blot* tidak dapat dinilai apakah *SHBG* varian homozigot atau heterozigot. Sesuai dengan penelitian Cornelisse *et al* (1994), hasil *Western blot* ini seharusnya menunjukkan gambaran sub unit *super heavy* yang lebih tebal pada *SHBG* varian homozigot jika dibandingkan dengan sub unit *super heavy* pada *SHBG* varian heterozigot. Walaupun frekwensi alel dalam penelitian ini tidak

dapat dihitung secara tepat, namun masih dapat dilakukan penghitungan besarnya kisaran frekwensi alel normal dan alel varian dari total 18 sampel serum dengan mengasumsikan bahwa ketujuh sampel dari fenotip *SHBG* tiga pita seluruhnya adalah varian heterozigot atau seluruhnya varian homozigot. Bila diasumsikan keseluruhan 7 sampel tersebut adalah varian heterozigot, maka jumlah alel normal pada 18 sampel yang diperiksa adalah $(11 \times 2) + (7 \times 1) = 29$ atau $29/36 \times 100\% = 81\%$. Bila diasumsikan ketujuh sampel adalah varian homozigot, maka jumlah alel normal pada 18 sampel yang diperiksa adalah $(11 \times 2) + (7 \times 0) = 22$ atau $22/36 \times 100\% = 61\%$. Dengan demikian besarnya frekwensi alel normal dalam penelitian ini berkisar antara 61%-81%. Dengan cara perhitungan serupa diperoleh kisaran frekwensi alel varian adalah $(7 \times 1)/36 \times 100\% = 19\%$ sampai $(7 \times 2)/36 \times 100\% = 39\%$.

Dari hasil penelitian ini, pemunculan *SHBG* normal yang terdeteksi ternyata lebih banyak dibandingkan dengan *SHBG* varian. Hal ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya di negara lain (pria Kaukasia) dimana pemunculan *SHBG* normal relatif lebih banyak jumlahnya yaitu 84,3%(Cousin et al.,1998) dibandingkan *SHBG* varian yang berjumlah 20%(Gershagen et al.,1987) dan 15,7%(Cousin et al.,1998). Hasil penelitian yang dilakukan oleh tim peneliti *SHBG* lain dari bagian Biologi (Biomedik) FKUI juga menunjukkan pemunculan *SHBG* normal yang lebih banyak (77%) dibandingkan *SHBG* varian (23%) pada populasi pria Kaukasia (Bernard,2002). Perbedaan jumlah pemunculan *SHBG* normal dan *SHBG* varian ini kemungkinan disebabkan karena

adanya perbedaan latar belakang genetik antar etnik dalam hal ini yaitu antara etnik Indonesia dan etnik Kaukasia. Hal tersebut juga ditemukan pada berbagai etnik yang telah diteliti sebelumnya (Baalen *et al.*, 1992). Namun pemunculan jumlah *SHBG* varian ini selalu lebih sedikit dibandingkan *SHBG* normal.

Hasil perhitungan kadar *SHBG* dari 18 sampel serum diperoleh dari data anggota tim peneliti lainnya (atas seijin penelitiannya) yang dikerjakan melalui teknik *IRMA* (*Immunoradiometric Assay*) dapat dilihat selengkapnya pada Tabel V.1.

TABEL V.1.

**JUMLAH PITA SHBG DAN KADAR SHBG
PADA SAMPEL SERUM PRIA
INDONESIA DEWASA SEHAT**

No. Urut	Umur (th)	Jumlah Pita SHBG	Kadar SHBG* (nmol/L)
1	43	2	27,60
2	35	2	65,19
3	31	2	28,21
4	30	2	48,07
5	43	2	34,78
6	36	2	23,03
7	42	2	62,76
8	40	2	41,67
9	47	2	60,03
10	44	2	26,14
11	36	2	47,17
12	41	3	35,23
13	37	3	38,29
14	45	3	61,59
15	42	3	11,03
16	41	3	38,26
17	45	3	65,20
18	43	3	26,48

* Normal : 10-73 nmol/L.

Berdasarkan tabel V.1 di atas tampak bahwa hasil perhitungan nilai rata-rata kadar fenotip *SHBG* dua pita tampak lebih besar dibandingkan dengan rata-rata kadar fenotip *SHBG* tiga pita (Tabel IV.2). Dari keseluruhan sampel, enam puluh satu persen (11 orang) menunjukkan pola fenotip *SHBG* dua pita dengan nilai rata-rata kadar *SHBG* 42,24 nmol/L. Sedangkan tiga puluh sembilan persen (7 orang) menunjukkan pola fenotip *SHBG* tiga pita dengan nilai rata-rata kadar *SHBG* 39,44 nmol/L (Tabel IV.2). Untuk mengetahui apakah perbedaan kadar *SHBG* ini cukup bermakna untuk diambil sebagai suatu kesimpulan maka data ini kemudian dianalisa dengan aplikasi program komputer *SPSS (Statistical Product and Service Solution)* versi 10.

Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa nilai t tidak bermakna pada tingkat signifikan 5% ($t = 0,343$ dengan $P = 0,736$, 2-tail test). (Lihat lampiran 3). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar *SHBG* pada fenotip *SHBG* tiga pita (*SHBG* varian) dengan fenotip *SHBG* dua pita (*SHBG* normal). Dengan demikian hipotesa kedua dalam penelitian ini yang menyatakan terdapat perbedaan kadar *SHBG* dari masing-masing jenis fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat, ternyata tidak terbukti (hipotesa ditolak). Meskipun demikian tidak tertutup kemungkinan adanya perbedaan yang cukup bermakna antara kadar *SHBG* pada fenotip *SHBG* dua pita dengan fenotip *SHBG* tiga pita bila sampel yang digunakan jumlahnya lebih besar mengingat dengan perhitungan kasar (tanpa menggunakan analisa statistik) masih dijumpai perbedaan

yang kecil antara kadar *SHBG* pada fenotip *SHBG* dua pita dan tiga pita. Selain itu, ketidakbermaknaan perbedaan kadar *SHBG* ini mungkin juga dipengaruhi oleh faktor-faktor lain misalnya nutrisi, yang dalam tesis ini tidak dibahas.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari 18 sampel serum pria Indonesia dewasa sehat yang diteliti menggunakan teknik *SDS PAGE* dan *Western blot*, tampak gambaran ekspresi gen *SHBG* yang terdiri dari dua macam pola fenotip *SHBG* dengan berat molekul yang berbeda. Pola fenotip *SHBG* dua pita yang diduga sebagai *SHBG* normal sebanyak 61% dihasilkan dari 11 sampel serum dengan perkiraan berat molekul sub unit *heavy* sebesar 51 kDa dan sub unit *light* sebesar 46 kDa. Sedangkan pola fenotip *SHBG* tiga pita yang diduga sebagai *SHBG* varian sebanyak 39% dihasilkan dari 7 sampel serum dengan perkiraan berat molekul sub unit ketiga yang merupakan sub unit *super heavy* sebesar 56 kDa. Pemunculan pola fenotip *SHBG* tiga pita (*SHBG* varian) dan pola fenotip dua pita (*SHBG* normal) dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya produk alel varian dan alel normal *SHBG*. Dengan demikian hipotesa pertama dalam penelitian ini yang menyatakan bahwa terdapat variasi fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat ternyata terbukti benar (hipotesa diterima).

Pemunculan jumlah *SHBG* varian yang lebih sedikit dibandingkan *SHBG* normal dalam penelitian ini, tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian sebelumnya yang menyebutkan pemunculan *SHBG* varian dari negara lain (pria

Kaukasia) sebesar 20%(Gershagen *et al.*,1987), 15,7%(Cousin *et al.*,1998) dan 23%(Bernard,2002) dibandingkan *SHBG* normal sebesar 84,3%(Cousin *et al.*,1998) dan 77%(Bernard,2002). Perbedaan jumlah pemunculan *SHBG* normal dan *SHBG* varian ini mungkin disebabkan karena adanya perbedaan latar belakang genetik antar etnik dalam hal ini yaitu antara etnik Indonesia dan Kaukasia.

Perhitungan nilai rata-rata kadar *SHBG* varian dan *SHBG* normal yang diperoleh dari hasil penelitian ini masing-masing adalah 39,44 nmol/L dan 42,24 nmol/L. Setelah dilakukan analisa statistik menggunakan program komputer SPSS versi 10 disimpulkan bahwa rata-rata kadar *SHBG* pada fenotip *SHBG* tiga pita (*SHBG* varian) tidak berbeda bermakna dibandingkan dengan rata-rata kadar *SHBG* pada fenotip *SHBG* dua pita (*SHBG* normal). Dengan demikian hipotesis kedua yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan kadar *SHBG* dari masing-masing jenis fenotip *SHBG* pada populasi pria Indonesia dewasa sehat, ternyata tidak terbukti (hipotesa ditolak).

Saran

Untuk memperoleh data yang lebih lengkap mengenai peranan variasi fenotip *SHBG* terhadap kadar *SHBG* dalam kaitannya dengan pengaturan hormon steroid seks pada kontrasepsi hormonal pria khususnya *TE* dan *DMPA*, diperlukan penelitian yang lebih intensif dan terpadu dengan jumlah sampel yang

lebih besar. Selain itu, mengingat dari hasil penelitian ini tidak menunjukkan adanya pengaruh variasi fenotip *SHBG* terhadap kadar *SHBG* maka disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melihat apakah variasi fenotip *SHBG* tersebut memiliki kemungkinan mempengaruhi secara langsung pada kadar testosteron bebas yang bekerja melalui poros hipotalamus-hipofisis pada proses penekanan spermatogenesis walaupun mekanismenya belum jelas.

SUMMARY AND CONCLUSION

Of the 18 serum samples of Indonesian healthy adults men analyzed by *SDS PAGE* and *Western blot* techniques, an expression of SHBG gene comprises of two types SHBG phenotype pattern with different molecular weight, are evident. The phenotype pattern of double banded SHBG which was assumed as the normal SHBG was produced by 11 serum samples (61 %) with estimated weight of 51 kDa for heavy sub unit and 46 kDa for light sub unit. While phenotype pattern of triple banded SHBG type which is assumed as the variant SHBG was produced by 7 serum samples (39 %) with estimated weight of 56 kDa for the third sub unit (super heavy sub unit). The appearance of phenotype pattern of triple banded SHBG (variant SHBG) and phenotype pattern of double banded SHBG (normal SHBG) from this research showed the existence of variant and normal allele product of SHBG. Hence, the first hypothesis in this research which indicated that there is a phenotype variation of SHBG in the Indonesian healthy adult males population is proven (accepted hypothesis).

The amount of variant SHBG is slightly less than the normal SHBG in this research, not far different from the result of previous research which indicated that the appearance of variant SHBG from other countries (Caucasian males) is 20 % (Gershagen *et al.*,1987), 15,7 % (Cousin *et al.*,1998) and 23 % (Bernard,2002) compared to normal SHBG amounting 84,3 % (Cousin *et al.*,1998) and 77%

(Bernard,2002). The different amount of normal SHBG and variant SHBG is probably caused by inter ethnic genetical background which in this case is Indonesian and Caucasian ethnics.

The average concentration of variant SHBG and normal SHBG which are the result of this investigation is 39,44 nmol/L and 42,24 nmol/L. After a statistical analysis has been conducted using a SPSS version 10, it is concluded that the average SHBG concentration of triple banded SHBG phenotype (variant SHBG) is not significantly different from average SHBG concentration of double banded SHBG phenotype (normal SHBG). Hence, the second hypothesis which indicated that there is a difference concentration of SHBG in each phenotype type in Indonesian healthy Indonesian adult males population, is not proven (hypothesis is rejected).

In order to obtain a more complete data about the role of SHBG phenotype variation with regard SHBG concentration in its relation with control of the sexual steroid hormone in a male hormonal contraceptive especially *TE* and *DMPA*, it is imperative that a more intensive and integrated research with a bigger sample size is conducted. Other than that, considering that the result in this investigation did not show an influence of SHBG phenotype variation on SHBG concentration, it is suggested to future investigators to see if such SHBG phenotype variation is in a position to directly influence free testosterone working through hipotalamus-hipofisis-testis axial at the process of spermatogenesis supression, even though the mechanism is not quite distinct.

DAFTAR PUSTAKA

- Amstrong B.K., Brown J.B., Clarke H.T., et al. (1981) Diet and reproductive hormones : a study of vegetarian and non vegetarian postmenopausal women. *J.Natl.cancer.Inst.*67:761-767.
- Anderson D.C. (1974) Sex Hormone Binding Globulin. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 3: 69-82.
- Avvakumov G.V., Matveentseva, Akhrem L.V., Sterl'chyonok O.A., Akhrem A.A. (1983) Study of carbohydrate moiety of human serum sex hormone binding globulin. *J.Biochem.Biophys.Acta.*760:104-110.
- Avvakumov G.V., Zhuk N.I., Strel'chenok O.A. (1988) Biological function of the carbohydrate component of the human sex steroid-binding globulin. *Biokhimiya*, Plenum Publishing Corporation, vol.53, 5:726-729.
- Baalen H.V., Convents R., Cailleau J., and Heyns W. (1992) Genetic variation of human sex hormone-binding globulin : evidence for a worldwide bi-allelic gene. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*vol.75, 1:135-139.
- Belanger A., Locong A., Noel C., et al. (1989) Influence of diet on plasma steroid and sex plasma binding globulin levels in adult men. *J. Steroid. Biochem.* 32 : 829-833.
- Bernard I. (2002) Variasi Sub Unit *SHBG* pada Pria Kaukasia Dewasa Sehat Serta Implikasinya terhadap Konsentrasi *SHBG*. Tesis Magister Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Berube D., Seralini G.E., Gagne R., and Hammond G.L. (1990) Localization of the human sex hormone-binding globulin gene (*SHBG*) to the short arm of chromosome 17 (17p12→p13). *J.Cytogenet.Cell.Genet.* 54:65-67.
- Biorad. Mini-Protean II Dual Slab Cell (instruction manual).
- Biorad. Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (instruction manual).
- Brenner P.F., Mischel D.R., Bernstein D.S., Ortiz A. (1977) Study of medroxyprogesterone acetate and testosterone enanthate as a male contraceptive. *Contraception* 15(6):679-691.

- Bocchinfuso W.P., Ma K.L., Lee W.M., Warmels-Rodenhiser S., and Hammond G.L. (1992) Selective removal of glycosylation sites from sex hormone-binding globulin by site-directed mutagenesis. *J. Endocrinol.* vol. 131, 5:2331-2336.
- Bollag D.M., Edelstein S.J. (1991) *Protein Methodes*. A John Wiley & Sons, Inc, Publication, New York. Hal : 145-152, 188-189.
- Clermont Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in animal : seminiferous epithelium cycle and spermatogenial renewal. *Physiol.Rev.*52:136.
- Cooper G..M. (2000) *The Cell : a molecular approach*. 2nd edition. ASM Press,Washington D.C., 296-298.
- Cornelisse M.M., Bennett P.E., Christiansen M., et al. (1994) Sex hormone binding globulin phenotypes : their detection and distribution in healthy adults and in different clinical conditions. *J.Clin.Chim.Acta.*225:115-121.
- Cousin P., Dechaud H., Grenot C., Lejeune H., Pugeat M. (1998) Human variant sex hormone-binding globulin (*SHBG*) with an additional carbohydrate chain has a reduced clearance rate in rabbit. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*83: 235-240.
- Danzo B.J., Bell B.W., BlackJ.H (1989) Human testosterone binding globulin is a dimer composed of two identical protomers that are differentially glycosylated. *J.Endocrinol.*Vol.124.6:2809-2816.
- DPC Diagnostic Products Corporation. IRMA-Count *SHBG* (instruction manual).
- Frairia R., Fortunati N., Revelli A., Guidetti D., Cavaglia S., Massobrio M. (1994) Binding of sex steroid binding protein to plasma membranes of human testis. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.*51 (5-6):319-22.
- Gershagen S., Henningsson K., and Fernlund P. (1987) Sub unit of human sex hormone binding globulin. *J. Biol.Chem.* vol. 262, 17: 8430-8437.
- Greenspan F.S., Baxter J.D. (1994) *Basic clinical endocrinology*. 4th ed. Prentice Hall International Inc, New Jersey. Hal :
- Griffin J.E., and Ojeda S.R. (1996) *Textbook of endocrine physiology*.3rd ed. Oxford University Press, New York. Hal: 51-52.

- Grishkovskaya I., Avvakumov G.V., Sklenar G., Dalcs D., Hammond G.L., Muller Y.A. (2000) Crystal structure of human sex hormone binding globulin : steroid transport by a laminin G-like domain. *J.EMBO.vol.19,4:504-512.*
- Gui-Yuan Z. (1990) Contraceptive efficacy of testosterone induced azoospermia in normal men. *The Lancet.336:955-959.*
- Hammond G.L. (1990). Molecular properties of corticosteroid binding globulin and the sex steroid binding protein. *J.Endocr.Rev.11:65-79.*
- Harris H. (1994) Dasar-dasar genetika biokemis manusia. Edisi ketiga. Gajahmada Uninersity Press. hal:450,525-528.
- Hammond G.L., Bocchinfuso W.P. (1996) Sex hormone binding globulin : gene organization and structure/function analyses. *J.Horm.Res.45:197-201.*
- Hammond G.L., Underhill D.A., Smith C.L. (1987) The cDNA deduced primary culture of human sex hormone binding globulin and its steroid binding domain. *J.Febs Lett.215:100-104.*
- Hampl R., Starka L. (1996) Sex hormone-binding globulin in endocrine regulation. *J. Endocrine Regulation. vol.30:56-65.*
- Hogeveen K.N., Talikka M., and Hammond G.L. (2001) Human sex hormone-binding globulin promoter activity is influenced by a (TAAAA)_n repeat element within an Alu sequence. *J.Biol.Chem. vol. 276, 39: 36383-36390.*
- Hyrb D.J., Khan M.S., Romas N.A., Rosner W. (1990) The control of the interaction of sex hormone binding globulin with its receptor by steroid hormones.*J.Biol.Chem.265:6048-6054.*
- Joseph D.R.(1994) Structure,function, and regulation of androgen binding protein/sex hormone binding globulin.*J.Vitam and Horm.49:197-280.*
- Key T.J.A., Roe L., Thorogood M., Moore J.W., Clark G.M.G., Wang D.Y. (1990) Testosterone,sex hormone-binding globulin, calculated free testosterone and estradiol in male vegans and omnivores. *Br J.Nutr.64;111-119.*
- Larrea F., Carino C., Hardy D.O., Musto N.A., and Catterall J.F. (1995) Genetic variations in human testosterone-estradiol binding globulin. *J. Steroid Biochem.Molec.Biol.vol.53,1-6:553-559.*

- Lermite V., Terqui M. (1991) Plasma sex steroid binding protein in mature heifer : effect of the reproductive status, nutritional levels and porcine growth hormone and estradiol treatment. *J.Biol.Reprod.*44:864-870.
- Lodish H., Baltimore D., Zipursky S.L., et al. (1995) *Molecular cell Biology*. 3rd ed. Scientific American Book, W.H. Freeman and Company, New York. Hal: 613-614.
- Longcope C., Goldfield S.R.W., Brambilla D.J., McKinlay J. (1990) Androgen, estrogen, and sex hormone-binding globulin in middle-aged men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*vol.71,6:1442-1446.
- Longcope C., Feldman H.A., McKinlay J.B., and Araujo A.B. (2000) Diet and sex hormone-binding globulin. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*vol. 85,1:293-296.
- Loukovaara M., Carson M., Adlercreutz H. (1995) Regulation of production and secretion of sex hormone-binding globulin in HepG2 cell cultures by hormones and growth factors. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*vol 80,1:160-164.
- Luckock A and Cavalli-Sforza L.L. (1983) Detection of genetic variation with radioactive ligands. V. Genetic variants of testosterone-binding globulin in human serum. *Am.J.Hum.Genet.*35:49-57.
- Marks D.B., Marks A.D., Smith C.M. (1987) *Biokimia kedokteran dasar, sebuah pendekatan klinis*. Alih bahasa : dr. Brahm U. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal:198.
- Moeloe N. (1993) Comparison of two androgen plus depot medroxyprogesterone acetate for suppression to azoospermia in Indonesian men. *J. Fertility and Sterility*. 60:1062-1068.
- Nakhla A.M., Leonard J., Hyrb D.J., Rosner W. (1999) Sex hormone-binding globulin receptor signal transduction proceeds via G protein. *J. Steroids*. 64 : 213-216.
- Nakhla A.M., Khan M.S., Rosner W. (1990) Biologically active steroids activate receptor-bound human sex hormone-binding globulin to cause LNCaP cells to accumulate adenosine 3',5'-monophosphate. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*vol.71,2:398-404.
- Nieschlag E and Behre H. (1997) *Andrology, Male Reproductive Health and Dysfunction*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. p 26-57

- Pangkahila W. (1991) Reversible azoospermia induced by an androgen-progestin combination regimen in Indonesian men. *Int.J.Androl.*14:248-256.
- Petrie A. (1996) Catatan kuliah statistika kedokteran. Edisi 2. Alih bahasa : dr.Ali Ghufroon Mukti. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Hal:253-255.
- Petra P.H., Namkung P.C., Senear D.F., Mc Crae D.A., Rousslang K.W., Teller D.C., Ross J.B.A. (1986) Molecular characterization of the sex steroid binding protein (SBP) of plasma..Reexamination of rabbit ABP and comparison with the human macaque and baboon protein. *J.Steroid.Biochem.*25:191-200.
- Petra P.H., Stanczyk F.Z., Senear D.F., Namkung P.C., Novy M.J., Ross J.B.A., Turner E., Brown J.A. (1983) Current status of the molecular structure and function of the plasma sex steroid binding protein (SBP). *J.Steroid.Biochem.*19:695-706
- Plymate S.R., Leonard J.M., Paulsen C.A., Forris B.L., Karpas A.E. (1983) Sex hormone binding globulin changes with androgen replacement. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*57: 645-648.
- Plymate S.R., Hoop R.C., Jones R.E., Matej L.A. (1990) Regulation of sex hormone-binding globulin production by growth hormone. *J.Metab.vol.* 39,9:967-970.
- Power S.G.A., Bocchinfuso W.P., Pallesen M., Warmels-Rodenhiser S., Baelen H.V., Hammond G.L. (1992) Molecular analyses of a human sex hormone-binding globulin Variant : evidence for an additional carbohydrate chain. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*4:1066-1068.
- Pugeat M., Crave J.C., Tourniaire J., Forest M.G. (1996) Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. *J.Horm.Res.*45:148-155.
- Reed M.J., Cheng R.W., Simmonds M., Richmond W., James V.H. (1987) Dietary lipids : an additional regulator of plasma levels of sex hormone binding globulin. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*64:1083-1085.
- Rosner W. (1990) The function of CBG and SHBG : recent advance. *Endocrine Rev.*11:80-91.

- Rosner W., Aden D.P., Khan M.S. (1984) Hormonal influences on the secretion of steroid binding protein by a human hepatoma-derived cell line. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*59:806-808.
- Rosner W., Hyrb D.J., Khan M.S., Nakhla A.M., Romas N.A. (1999) Sex hormone-binding globulin mediates steroid hormone signal transduction at the plasma membrane. *J.Steroid.Biochem.Molec.Biol.*69:481-485.
- Rosner W., Smith R.N. (1975) Isolation and characterization of the testosterone-binding globulin from human plasma. Use of a novel affinity column. *J.Biochemistry.*14:4813-4820.
- Santoso S. (2001) SPSS versi 10, Mengolah data statistik secara profesional. Penerbit PT Elex Media Komputindo, Kelompok Gramedia-Jakarta. Hal : 10-15, 219-222, 236-247, 261.
- Soewoto H. (2000) Peran protein dalam transduksi sinyal, dalam kumpulan makalah peran dan pemanfaatan teknologi protein dalam perkembangan ilmu kedokteran. Bagian Biokimia, FKUI, Jakarta.
- Staub J.J., Conti A., Huber P. (1978) Sex hormon bindendes globulin (*SHBG*), ein neuer metabolischer in vitro test der schilddrüsensfunktion. *Schweiz Med Wschr.*108:1909-1911.
- Steinberger E. (1979) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol.Rev.*51:1-22.
- Sudjana. (1975) Metoda Statistika. Penerbit Tarsito, Bandung. Hal: 164-166.
- Sui L.M., Lennon J., Ma C., Mc Cann I., Woo L., Petra P.H. (1999) Heterologous expression of wild type and deglycosylated human sex steroid-binding protein (SBP or *SHBG*) in the yeast, *Pichia pastoris*. Characterization of the recombinant protein. *J. Steroid. Biochem.Molec.Biol.*68:119-127.
- Sutyarso. (1997) Pengaruh pemberian pakan berkadar protein, lemak, dan karbohidrat berbeda terhadap timbulnya azoospermia pada monyet jantan (*Macaca fascicularis*) yang disuntik kombinasi testosteron enantat (TE) dan depot medroksiprogesteron asetat (DMPA). Disertasi S3, Program Pascasarjana, Universitas Indonesia, Jakarta.

- Toscano V., Balducci R., Bianchi P., Guglielmi R., Mangiantini A., Sciarra F.(1992) Steroidal and non-steroidal factors in plasma sex hormone binding globulin regulation. *J.Steroid.Biochem.Molec.Biol.*vol.43,5:431-437.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : Procedure and some applications. *J.Biochem.*Vol.76,9:4350-4354.
- Turner E.E., Ross J.B.A., Namkung P.C., Petra P.H. (1984) Purification and characterization of the sex steroid binding protein from macaque serum comparison with the human protein. *J.Biochemistry.*23:492-497.
- Vermeulen A., Kaufman J.M., Giagulli V.A. (1996) Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*Vol.81,5:1821-1825.
- Walsh R.A., Titani K., Takio k., Kumar S., Hayes R., Petra P.H. (1986) Amino acid sequence of the sex hormone binding globulin and its steroid-binding domain. *FEBS.Lett.*215:100-104.
- World Health Organization (WHO). (1990) Contraceptive efficacy of testosterone Induced azoospermia in normal men. *Lancet* 336:955-959.
- Wu F.C.W., Aitken R.J. (1989) Supression of sperm function by DMPA and TE in steroid male contraception. *J.Fertil.Steril.*51:691-698.

LAMPIRAN 1



Skema kerangka penelitian variasi fenotip *SHBG* pada pria Indonesia dewasa sehat serta kemungkinan pengaruhnya dengan kadar *SHBG*

LAMPIRAN 2

Alat :

- *Syringe* ukuran 10 cc
- Tabung kaca steril
- Alat sentrifugasi (*Braun Knecht-Heimann-Co*)
- Tabung *eppendorf* 1,5 ml
- Pipet *eppendorf* dengan tip
- *Sintered glass filter*
- Tabung labu *Erlemeyer* dengan tutup karet
- Pompa penyedot hampa udara dengan selang plastik
- Batang pengaduk dari kaca
- Tabung reaksi
- *Waterbath shaker* (*Elmeco*,model WB-20)
- Pipet transfer
- Rak tabung *eppendorf*
- *Magnetic bar stirrer*
- *Decker glass*
- Gelas ukur
- pH meter (P107 *Consort*)
- *Magnetic bar stirrer* (*Nuova II stir plate-Thermolyne*)
- Timbangan (*Sartorius*)

- Kertas saring (*Mini Tras-Blot Filter Paper, Biorad*)
- Membran *Immobilon-P*, ukuran pori 0,45 mm (*Sigma*)
- Bantalan serabut (*Fiber pad*)
- Sempit Hamilton
- Pemasok daya (model 200/2.0 *power supply, Biorad*)
- *Mesin Microfuge(Beckman mirofuge)*
- Wadah *pyrex*
- Gunting
- Kertas Aluminium foil
- Pensil dan penggaris
- Pinset anatomi

Reagensia :

- H_2O_2 30%
- Larutan *potassium permanganat*
- Tris (*hydroxymethyl*)-aminomethane (*Biorad,cat.no.161-07160*)
- HCL (*BDH,cat.no.10241*)
- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*)(*Biorad,cat.no.161-0301*)
- APS (*Ammonium persulfate*)(*Biorad,cat.no.161-0700*)
- KCL (*BDH,cat.no.29594*)
- *Aquadest*
- *Aquabidest*

- Alkohol
- *Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia, cat.no. 17-0830-01)*
- *Acrylamide (Biorad, cat no. 161-0100)*
- *TEMED (N,N,N',N' – tetra methyl-ethylene-diamine) (Biorad, cat.no. 161-0801)*
- *Methanol (Merck, cat.no. UN 1230)*
- *Acetic acid glacial (Merck, cat.no. UN 2789)*
- *Glycine (Biorad, cat.no. 1610717)*
- *Glycerol (Promega, cat.no. H 5433)*
- *Bromophenol blue (Biorad, cat no. 161-0404)*
- *SDS PAGE Low Range Molecular Weight standart (Biorad, cat.no. 161-0304)*
- *Commassie blue R-250 (Biorad, cat.no. 161-0400)*
- *Amido black 10-B (Merck, catalog no. 1167)*
- *Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, cat.no. SC 2322)*
- *Tween 20 (Merck, cat.no. 822184)*
- *NaCl (BDH, cat.no. 10241)*
- *Polyclonal rabbit antihuman SHBG (A350) (Biogenesis, DAKO A/S, Glostrup, Denmark, cat.no. D 0487)*

- *Polyclonal goat anti rabbit Ig yang terkonjugasi dengan alkaline phosphatase (D487) (Biogenesis, DAKO A/S, Glostrup, Denmark, cat.no.A 980564)*
- *Triton X-100 (Biorad, cat no.161-0407)*
- *BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Promega, cat.no.S 3816)*
- *NBT (Nitro blue tetrazolium)(Promega, cat.no.S 3806)*
- *EDTA(Ethylenediaminetetra acetic acid)(BDH, Chemical ,Australia, cat.no.10093)*

LAMPIRAN 3

HASIL ANALISA DATA SECARA STATISTIK DENGAN PROGRAM SPSS VERSI 10

Dari hasil penelitian pada populasi pria Indonesia dewasa sehat, dengan menggunakan 18 sampel serum, diperoleh data dua jenis pola sub unit *SHBG* yang digolongkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok sub unit *SHBG* dua pita (*SHBG* normal) dan kelompok sub unit *SHBG* tiga pita (*SHBG* varian). Kadar *SHBG* dari masing-masing kelompok sub unit tersebut kemudian diperiksa dan ingin diketahui apakah kadar *SHBG* pada kelompok sub unit *SHBG* tiga pita berbeda dengan kadar *SHBG* pada kelompok sub unit *SHBG* dua pita. Oleh karena itu data yang diperoleh diperlakukan sebagai data yang tidak berpasangan (*unrelated*). Sebelum dilakukan pengujian hipotesa statistik, masing-masing kelompok data diuji tingkat kenormalannya dengan uji **Kolmogorov-Smirnov** dan homogenitas variansinya dengan uji **F (F-Test atau Levene's Test)**. Hipotesa statistik dari penelitian ini dibuktikan dengan uji **T (T-test)**. Batas kemaknaan yang digunakan adalah pada $P(2\alpha) = 0,05$. Ketiga macam uji statistik tersebut menggunakan aplikasi program statistik *SPSS* versi 10 (Santoso S. 2001).

'NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Kadar SHBG
N		18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	41.1517
	Std. Deviation	16.4517
Most Extreme Differences	Absolute	.152
	Positive	.125
	Negative	-.152
Kolmogorov-Smirnov Z		.646
Asymp. Sig. (2-tailed)		.799

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Distribusi Populasi

Hipotesis :

H_0 : populasi $F(x)$ = populasi $F_0(x)$, dengan $F(x)$ adalah fungsi distribusi populasi yang diwakili oleh sampel, dan $F_0(x)$ adalah fungsi distribusi suatu populasi berdistribusi normal dengan $\mu = 41,15$ dan $\delta = 16,45$.

H_1 : populasi $F(x) \neq$ populasi $F_0(x)$ atau distribusi tidak normal.

Pengambilan Keputusan :

- Jika probabilitas (P) $> 0,05$, maka H_0 diterima
- Jika probabilitas (P) $< 0,05$, maka H_0 ditolak

Keputusan :

Ternyata dari hasil perhitungan didapatkan nilai uji Kolmogorov-Smirnov untuk kadar *SHBG* adalah 0,646 dengan probabilitas (P) = 0,799. Oleh karena probabilitas $> 0,05 \rightarrow H_0$ diterima artinya distribusi populasi dari kelompok ini adalah normal.

T-Test

Group Statistics

	Jumlah Pita	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Kadar SHBG	2.00	11	42.2409	15.5497	4.6884
	3.00	7	39.4400	18.9285	7.1543

Independent Samples Test

	Levene's Test Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of Difference	
								Lower	Upper
KADAR SHBG Equal variances assumed	.018	.896	0.343	18	.736	2.8009	8.1692	-14.5170	20.1188

Uji Homogenitas Varians Menggunakan Uji F (F-Test atau Levene's Test)

Hipotesis :

Ho : kedua varians populasi adalah identik (homogen).

H1 : kedua varians populasi adalah tidak identik (tidak homogen).

Pengambilan keputusan :

- Jika probabilitas (P) > 0,05 maka Ho diterima.

- Jika probabilitas (P) < 0,05 maka Ho ditolak.

Keputusan :

Terlihat bahwa F hitung untuk kadar SHBG adalah 0,018 dengan probabilitas 0,896.

Oleh karena probabilitas > 0,05 → Ho diterima, artinya kedua varian populasinya adalah identik (homogen).

Oleh karena tidak ada perbedaan yang nyata dari kedua varians, maka varians digunakan untuk membandingkan rata-rata populasi (atau tes untuk Equality of

Means) menggunakan uji T (T-Test) dengan dasar Equal variance assumed (diasumsikan kedua varians sama).

Uji T (T-Test) Untuk Asumsi Varians Sama

Hipotesis :

Ho : kedua rata-rata populasi adalah identik (rata-rata populasi kadar fenotip *SHBG* 3 pita tidak berbeda bermakna dengan kadar fenotip *SHBG* 2 pita).

H1 : kedua rata-rata populasi adalah tidak identik (rata-rata populasi kadar fenotip *SHBG* 3 pita berbeda bermakna dengan kadar fenotip *SHBG* 2 pita).

Pengambilan keputusan :

- Jika probabilitas $> 0,05$ maka Ho diterima.
- Jika probabilitas $< 0,05$ maka Ho ditolak

Keputusan :

Terlihat bahwa t hitung untuk kadar *SHBG* dengan Equal varians assumed (diasumsikan kedua varians sama) adalah 0,343 dengan probabilitas (2α) adalah 0,736. Oleh karena probabilitas $> 0,05 \rightarrow$ Ho diterima, artinya rata-rata kadar fenotip *SHBG* 3 pita (*SHBG* varian) tidak berbeda bermakna dengan rata-rata kadar fenotip *SHBG* 2 pita (*SHBG* normal).

Hasil keputusan yang sama juga didapat dengan melihat tabel uji T (Lampiran 5).

Menurut tabel uji T (Lihat lampiran 5. Tabel Persentase Distribusi t) dengan derajat kebebasan ($df = \text{degree of freedom}$) = 16, maka nilai t sebesar 0,343 terletak diantara nilai probabilitas (P atau 2α) 0,70 dan 0,80 atau dapat ditulis sebagai berikut :

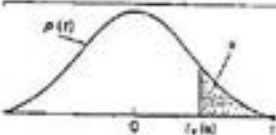
$$0,70 < P < 0,80$$

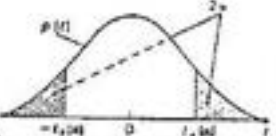
Karena hasil perhitungan diatas nilai probabilitasnya $> 0,05 \rightarrow$ Ho diterima.

Kesimpulan : Rata-rata kadar fenotip *SHBG* 3 pita (*SHBG* varian) tidak berbeda bermakna dengan rata-rata kadar fenotip *SHBG* 2 pita (*SHBG* normal).

LAMPIRAN 4

TABEL PERSENTASE DISTRIBUSI t^*


 Persentase, $\alpha/100$ di atas yang terlewat 100% probabilitas keseluruhan distribusi bagi t berbagai nilai v dan α . Distribusi ialah kurang simetri $t_{\alpha/2}(n) = 0$ sedemikian sehingga $t_{\alpha/2} = -t_{\alpha/2}$.


 Persentase, $\alpha/100$ juga ditabulasi untuk berbagai nilai v dan 2α . Perincian diberikan di atas bagi distribusi kedua ekor, 100% probabilitas keseluruhan yang terlewat di atas $t_{\alpha/2}$ dan 100% keseluruhan probabilitas terlewat di bawah $-t_{\alpha/2}$.

DK v	α 2α	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.010	0.005	0.0005	0.0001
1		0.158	0.325	0.510	0.727	1.000	1.378	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657	316.819	636.569
2		0.142	0.289	0.443	0.617	0.816	1.061	1.385	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	31.598	12.924
3		0.137	0.277	0.424	0.584	0.765	0.978	1.259	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	12.924	12.924
4		0.134	0.271	0.414	0.569	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	8.610	8.610
5		0.132	0.267	0.408	0.559	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	6.869	6.869
6		0.131	0.265	0.404	0.553	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.959	5.959
7		0.130	0.263	0.402	0.549	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.958	3.499	5.408	5.408
8		0.130	0.262	0.399	0.546	0.706	0.890	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	5.041	5.041
9		0.129	0.261	0.398	0.543	0.701	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.781	4.781
10		0.129	0.260	0.397	0.542	0.699	0.879	1.093	1.372	1.812	2.226	2.764	3.169	4.587	4.587
11		0.129	0.260	0.396	0.540	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106	4.437	4.437
12		0.128	0.259	0.395	0.539	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055	4.318	4.318
13		0.128	0.259	0.394	0.538	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.659	3.012	4.221	4.221
14		0.128	0.258	0.393	0.537	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977	4.140	4.140
15		0.128	0.258	0.393	0.536	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947	4.073	4.073
16		0.128	0.258	0.392	0.535	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921	4.015	4.015
17		0.128	0.257	0.392	0.534	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898	3.963	3.963
18		0.127	0.257	0.392	0.533	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878	3.922	3.922
19		0.127	0.257	0.391	0.533	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861	3.883	3.883
20		0.127	0.257	0.391	0.533	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.085	2.528	2.845	3.850	3.850
21		0.127	0.257	0.391	0.532	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831	3.819	3.819
22		0.127	0.256	0.390	0.532	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819	3.792	3.792
23		0.127	0.256	0.390	0.532	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807	3.767	3.767
24		0.127	0.256	0.390	0.531	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797	3.745	3.745
25		0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787	3.725	3.725
26		0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779	3.707	3.707
27		0.127	0.256	0.389	0.531	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771	3.690	3.690
28		0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763	3.674	3.674
29		0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.043	2.462	2.756	3.659	3.659
30		0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750	3.646	3.646
40		0.126	0.255	0.388	0.529	0.681	0.851	1.050	1.303	1.684	2.021	2.423	2.704	3.551	3.551
50		0.126	0.255	0.388	0.529	0.679	0.849	1.047	1.299	1.676	2.009	2.403	2.678	3.497	3.497
100		0.126	0.254	0.386	0.526	0.677	0.845	1.042	1.290	1.660	1.984	2.364	2.626	3.391	3.391
200		0.126	0.254	0.386	0.525	0.676	0.843	1.039	1.286	1.653	1.972	2.345	2.601	3.340	3.340
∞		0.126	0.253	0.385	0.524	0.674	0.842	1.036	1.282	1.645	1.960	2.326	2.576	3.291	3.291

* Dikutip dari Petrie A., (1996)