



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL *Uncaria gambir* (Hunter)
Roxb. TERHADAP VIABILITAS GALUR SEL HEPG2 DAN
KORELASINYA TERHADAP EKSPRESI SITOGLOBIN, NRF2
DAN PDGFA**

TESIS

DEASYKA YASTANI

2006614260

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
JAKARTA
JUNI 2023**



UNIVERSITAS INDONESIA

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL *Uncaria gambir* (Hunter)
Roxb. TERHADAP VIABILITAS GALUR SEL HEPG2 DAN
KORELASINYA TERHADAP EKSPRESI SITOglobin, NRF2
DAN PDGFA**

TESIS

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Magister Ilmu Biomedik (M. Biomed)**

DEASYKA YASTANI

2006614260

**FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
KEKHUSUSAN BIOKIMIA
JAKARTA
JUNI 2023**

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri, dan semua sumber yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : dr. Deasyka Yastani

NPM : 2006614260

Tanda Tangan :

Materai 10.000

Tanggal : 19 Juni 2023

tesis

ORIGINALITY REPORT

11 %
SIMILARITY INDEX

10 %
INTERNET SOURCES

4 %
PUBLICATIONS

4 %
STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to Universitas Indonesia Student Paper	1 %
2	www.mdpi.com Internet Source	1 %
3	ejournal3.undip.ac.id Internet Source	1 %
4	www.scribd.com Internet Source	1 %
5	jurnal.unej.ac.id Internet Source	1 %
6	idoc.pub Internet Source	1 %
7	adoc.pub Internet Source	<1 %
8	pt.scribd.com Internet Source	<1 %
9	123dok.com Internet Source	<1 %

HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Deasyka Yastani
NPM : 2006614260
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh Ekstrak Etanol *Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb. terhadap viabilitas galur sel HepG2 dan korelasinya terhadap ekspresi Sitoglobin, Nrf2 dan PDGFA

Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Ilmu Biomedik pada Program Studi Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

DEWAN PENGUJI

Pembimbing I : Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS

()

Pembimbing II : Dr. dr. Syarifah Dewi, M. Biomed

()

Penguji I : Dr. dr. Novi Silvia Hardiany, M. Biomed

()

Penguji II : Dr. Melva Louisa, S.Si, Apt, M. Biomed

()

Penguji III : Dr. Ade Arsianti, S.Si., M.Si.

()

Ditetapkan di : Jakarta

Tanggal : Juni 2023

Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik

Prof. dr. Wawaimuli Arozal, M. Biomed., Ph.D.



KATA PENGANTAR

Penulis memanjatkan puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa berkat, rahmat, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Etanol *Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb. terhadap viabilitas galur sel HepG2 dan korelasinya terhadap ekspresi Sitoglobin, Nrf2 dan PDGFA. Tesis ini merupakan salah satu syarat dalam mencapai gelar Magister Ilmu Biomedik di Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.

Penulis menyadari bahwa selama proses perkuliahan, penelitian, hingga penyusunan tesis ini terdapat banyak sekali dukungan dan bantuan yang diberikan oleh berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr.rer.physiol. dr. Septelia Inawati Wanandi selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik dan Dr. Dra. Puspita Eka Wuyung, MS selaku Sekertaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia yang telah menerima dan memberikan kesempatan sebagai mahasiswa PMIB FKUI.
2. Prof. dr. Wawaimuli Arozal, M. Biomed., Ph.D. selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedik 2023 dan Dr. Rani Wardani Hakim, S.Si., apt., M. Biomed selaku Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedik 2023, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia yang telah memberikan kesempatan, dukungan, serta bantuan dalam banyak hal selama proses perkuliahan serta penelitian.
3. Prof. Dr. dr. Sri Widia A. Jusman, MS selaku pembimbing pertama sekaligus pembimbing akademik yang selalu meluangkan waktu, tenaga dalam memberikan ide penelitian, nasehat, bimbingan dan solusi serta semangat kepada penulis dalam perkuliahan, penelitian, dan penyusunan tesis ini. Rasa hormat, kagum dan terima kasih yang tidak terhingga saya ucapkan kepada beliau karena memberikan saya kepercayaan menulis hibah, memberikan semangat walau gagal dalam beberapa kali penulisan hibah lainnya. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.

4. Dr. dr. Syarifah Dewi, M.Biomed selaku Kepala peminatan kekhusuan Biokimia, dan selaku pembimbing kedua yang selalu memberikan waktu, tenaga dalam memberikan arahan, nasehat, dan solusi serta semangat kepada penulis dalam perkuliahan, penelitian, penulisan, dan penyusunan tesis ini. Semoga Allah SWT memberikan berkah dan rahmatNya.
5. Dr. dr. Novi Silvia Hardiany, M. Biomed, Dr. Melva Louisa, Apt. M.Biomed, S.Si, dan Dr. Ade Arsianti, S.Si., M.Si. selaku dewan penguji yang telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya serta memberikan arahan dalam penelitian serta perbaikan dalam penulisan tesis ini.
6. Hibah Penelitian Tesis Magister Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) tahun 2022 yang telah mendanai penelitian ini.
7. Dr.dr. Raditya Wratsangka, Sp.OG. Subsp. Obginsos selaku Dekan Fakultas Kedokteran Trisakti yang memberikan ijin belajar dan dukungan bagi penulis sehingga penulis dapat menjalani Program Magister Ilmu Biomedik.
8. dr. Yohana, M. Biomed selaku Kepala Bagian Biokimia Kedokteran Trisakti, dan dr. Endrico X, M. Biomed selaku staf Biokimia Kedokteran Trisakti yang memberikan kepercayaan, semangat, dan nasehat bagi penulis sehingga penulis dapat menjalani Program Magister Ilmu Biomedik kekhususan Biokimia.
9. Seluruh dosen Program Magister Ilmu Biomedik dan Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia atas segala ilmu yang diberikan selama masa perkuliahan dan penelitian.
10. Seluruh staf Program Magister Ilmu Biomedik, Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (Pak Dani, Bu Halimah, Bu Erna, Bu Nia, Pak Arif, Pak Ondi, Pak Hilman, dan Pak Darul) yang telah banyak membantu penulis selama studi, baik keperluan penelitian, penyusunan tesis, serta administrasi pendidikan dan penelitian.
11. Dr. Sri Ningsih, Apt. dari Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN), Serpong, Tangerang yang memberikan ekstrak etanol gambir pada penulis.
12. Orang tua penulis tercinta Atang Yastani dan Tjen Nio yang memberikan

banyak semangat dan kasih sayang. Tidak ada ungkapan yang sepadan dengan semua perjuangan ayah dan ibu saya. Doa tulus semoga ayah dan ibu selalu diberikan kesehatan dan kebahagiaan .

13. Suami penulis yang tercinta, dr. Jimmy Panji, Sp. OG atas segala perhatian, kasih sayang, kesabaran, dan kesediaan menjaga anak-anak bersama dengan penuh cinta.
14. Anak-anak tercinta Kenji PW, dan Kalandra Sivali PW yang selalu bilang mama pasti bisa, dan kesabaran mereka atas berkurangnya waktu bersama.
15. Teman penelitian penulis yaitu Susi Rahmiyati, Raisa Nauli, Fista Amalia, Riska, Mba Irah, Mba Tiwuk, dan Mba Nuzli. Terima kasih banyak atas semangat, keceriaan bersama, dan perjuangan yang sudah dilakukan bersama-sama.
16. Teman-teman regular PMIB yaitu Novi Tanjung, Nounik Cheri, Nina F, Sri Octa, Kurnia, Dewi, Mba Nanda, Kevin, Lenny, Debby, dan Indria yang telah banyak memberikan bantuan, dukungan, dan saling bekerja sama selama masa perkuliahan berlangsung hingga penyelesaian tesis ini.
17. Teman-teman Himamib PMIB : Dyah, Regita, Sabi, Iqlima, Mahardika atas segala semangat, dan kegiatan positif di luar perkuliahan.
18. Teman-teman Program Magister Ilmu Biomedik yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, terima kasih atas kebersamaannya selama masa perkuliahan berlangsung.
19. Seluruh pihak terkait lainnya yang tidak dapat disebutkan satu per satu, yang telah membantu peneliti dimulai dari masa perkuliahan dan pembelajaran berlangsung hingga penulisan serta penulisan tesis ini. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, maka saran dan kritik yang konstruktif dari berbagai pihak sangat diperlukan guna perbaikan di masa mendatang. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi semua pihak dan dapat mencerdaskan kehidupan bangsa.

Jakarta, Juni 2023

Penulis

HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Deasyka Yastani
NPM : 2006614260
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Departemen : Biokimia dan Biologi Molekuler
Fakultas : Kedokteran
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul: **“Pengaruh Ekstrak Etanol *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. terhadap viabilitas galur sel HepG2 dan korelasinya terhadap ekspresi Sitoglobin, Nrf2 dan PDGFA”** beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Jakarta
Pada tanggal : Juni 2023
Yang menyatakan

(Deasyka Yastani)

ABSTRAK

Nama : Deasyka Yastani
Program Studi : Magister Ilmu Biomedik
Judul Tesis : Pengaruh Ekstrak Etanol *Uncaria Gambir*
(Hunter) Roxb. terhadap viabilitas galur sel HepG2
dan korelasinya terhadap ekspresi Sitoglobin,
Nrf2 dan PDGFA

Karsinoma hepatoseluler (HCC) merupakan masalah kesehatan global dengan tatalaksana yang belum memberikan hasil optimal. Gambir adalah tanaman spesifik Indonesia, yang mengandung flavonoid, dan digunakan sebagai antikanker. Pada patogenesis HCC terjadi disregulasi CYGB, Nrf2, dan PDGFA. Jusman *et al* mendapatkan bahwa senyawa dalam gambir dapat berikatan dengan PDGFA. Penelitian ini digunakan ekstrak etanol gambir (EG), dan bertujuan untuk menilai pengaruh EG terhadap viabilitas galur sel HepG2, dan korelasinya terhadap ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA. Optimasi konsentrasi DMSO sebagai pelarut EG, dan konsentrasi EG pada HepG2 (IC₅₀) dianalisis dengan uji MTT. Sel HepG2 diisolasi proteinnya dan ekspresi Nrf2, dan PDGFA menggunakan ELISA, serta CYGB menggunakan ELISA dan Imunofluoresens. Analisis proliferasi sel HepG2 dengan uji BrdU. Hasil dari analisis viabilitas, proliferasi, dan ELISA dari kelompok kontrol dan perlakuan dibandingkan secara statistik. Kami juga menganalisis korelasi antara masing-masing variabel. Hasil menunjukkan pemberian EG konsentrasi 500; 1000; dan 2000 µg/mL menyebabkan penurunan viabilitas sel, proliferasi sel, serta penurunan ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA sebanding dengan peningkatan pemberian konsentrasi EG. Terdapat korelasi positif dan bermakna antara viabilitas dengan proliferasi sel HepG2. Terdapat korelasi positif dan bermakna antara viabilitas sel HepG2 dengan ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA. Selain itu, terdapat korelasi positif dan bermakna antara ekspresi CYGB dengan Nrf2, dan protein Nrf2 dengan PDGFA, dan protein CYGB dengan PDGFA. Disimpulkan pemberian EG menurunkan viabilitas, dan proliferasi sel HepG2 serta terbukti menurunkan ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA.

Kata kunci : HepG2, ekstrak etanol gambir, sitoglobin, Nrf2, PDGFA.

ABSTRACT

Name : Deasyka Yastani
Study Program : Master Programme of Biomedical Science
Judul Tesis : Effect of Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.)
Ethanol Extract on Proliferation of Hep G2 :
Focus on Expression of Cytoglobin, Nrf2, and
PDGFA

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a global health problem with treatment has not provided optimal results. Gambir is an Indonesian specific plant, which contains flavonoids, and is used as an anticancer. Gambir is an Indonesian specific plant, which contains flavonoids, and is used as an anticancer. In the pathogenesis of HCC dysregulation of Nrf2, CYGB, and PDGFA occurs. Jusman et al found that compounds in gambir can bind to PDGFA. This study used gambier ethanol extract (EG), and aimed to assess the effect of EG on HepG2 cell proliferation, as well as the expression of CYGB, Nrf2, and PDGFA. Optimization of DMSO concentration as EG solvent, and EG concentration in HepG2 (IC₅₀) were analyzed by MTT test. Protein of HepG2 were isolated and expression of Nrf2 and PDGFA used ELISA, and CYGB used ELISA and Immunofluorescence. Analysis of HepG2 cell proliferation with BrdU assay. Results from viability, proliferation, and ELISA analyses of the control and treatment groups were compared statistically. We also analyzed the correlation between each variable. The results showed the administration of EG concentration 500; 1000; and 2000 µg/mL led to decreased cell viability, cell proliferation, and decreased expression of CYGB, Nrf2, and PDGFA proteins comparable to an increase in EG concentration. There is a positive and significant correlation between viability and proliferation of HepG2 cell. There is a positive and significant correlation between HepG2 cell viability and CYGB, Nrf2, and PDGFA protein expression. In addition, there is a positive and significant correlation between the expression of CYGB and Nrf2, the protein Nrf2 and PDGFA, and the expression of CYGB with PDGFA. It was concluded that EG administration decreased the viability, and proliferation of HepG2 cells and was shown to decrease the expression of CYGB, Nrf2, and PDGFA.

Keywords : HepG2, gambir ethanol extract, cytoglobin, Nrf2, PDGFA.

DAFTAR ISI

Halaman Judul.....	i
Halaman Pernyataan Orisinalitas.....	ii
Lembar turnitin.....	iii
Halaman Pengesahan.....	iv
Kata Pengantar.....	v
Halaman Pernyataan Persetujuan Publikasi Tugas Akhir Untuk Kepentingan Akademis.....	viii
Abstrak.....	ix
Abstract.....	x
Daftar Isi.....	xi
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Gambar.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
Daftar Singkatan.....	xvi
 BAB I PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis Penelitian.....	4
1.5 Manfaat Penelitian.....	4
1.6 Kerangka Teori.....	5
1.7 Kerangka Konsep	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	 7
2.1 Tanaman gambir	7
2.2 Karsinoma Hepatoseluler.....	10
2.2.1 Epidemiologi HCC.....	10
2.2.2 Patogenesis Molekuler dari HCC.....	10
2.3 Nrf2.....	12
2.3.1 Struktur protein Nrf2	12
2.3.2. Struktur protein KEAP1.....	14
2.3.3. Regulasi Nrf2.....	14
2.4 <i>Platelet-derived growth factors</i>	16
2.5 Kaitan Nrf2 dan PDGF	17
2.6 Sitoglobin	17
2.6.1 Struktur CYGB	18
2.6.2 Peran CYGB pada kanker.....	18

BAB 3 METODE PENELITIAN.....	20
3.1 Desain Penelitian	20
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	20
3.3 Sampel Penelitian.....	20
3.4 Alat dan Bahan	21
3.5 Cara Kerja	22
3.5.1 Pembuatan Medium Pertumbuhan Komplit.....	22
3.5.2 Kultur sel	22
3.5.3 Optimasi Konsentrasi DMSO terhadap sel Hep G2.....	23
3.5.4 Persiapan sampel uji EG untuk perlakuan	24
3.5.5 Uji Konsentrasi Hambatan Setengah Maksimal (IC ₅₀) EG terhadap Sel HepG2.....	26
3.5.6 Kultur Sel untuk Isolasi Protein	26
3.5.7 Isolasi dan pengukuran protein total.....	26
3.5.8 Pemeriksaan kadar sitoglobin dengan metode ELISA.....	27
3.5.9 Pemeriksaan kadar Nrf2 dengan metode ELISA.....	28
3.5.10 Pemeriksaan Kadar PDGFA Menggunakan Metode ELISA.....	28
3.5.11 Analisis Proliferasi Sel.....	29
3.5.12 Analisis kadar protein CYGB dengan imunofluoresens.....	30
3.5.13 Analisis Data	31
3.6 Alur Penelitian.....	32
 BAB IV HASIL PENELITIAN.....	 33
4.1 Kultur sel HepG2.....	33
4.2 Optimasi konsentrasi DMSO (sebagai pelarut EG) melalui uji viabilitas Sel Hep G2 pada pemaparan 24, 48, dan 72 Jam.....	34
4.3 Uji toksisitas EG terhadap sel Hep G2.....	35
4.4. Kadar protein total dalam kultur sel Hep G2 yang diberi berbagai kadar EG dan pada kelompok kontrol	35
4.5 Kadar protein Nrf2 sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol.	37
4.6 Kadar PDGFA sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol	38
4.7 Kadar protein CYGB dalam sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol	39
4.8 Analisis ekspresi protein CYGB dalam sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol.....	4
4.9 Proliferasi sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol	42
4.10 Korelasi antara Viabilitas sel HepG2 dengan Proliferasi sel HepG2.....	42
4.11 Korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan proliferasi sel HepG2; Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2; PDGFA dengan proliferasi sel HepG2.....	42
4.12 Korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan viabilitas sel HepG2;Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2 ; PDGFA dengan viabilitas sel HepG2.....	43
4.13 Korelasi antara Ekspresi Protein CYGB dengan Nrf2 ; Ekspresi Protein PDGFA dengan CYGB ; Protein Nrf2 dengan PDGFA	43

BAB 5 PEMBAHASAN	44
5.1 Penggunaan kultur sel HepG2.....	44
5.2 Optimasi konsentrasi DMSO sebagai pelarut EG melalui uji viabilitas	45
5.3 Uji IC50 terhadap sel Hep G2.....	45
5.4 Pemberian EG Menurunkan Ekspresi Nrf2 pada sel HepG2.....	45
5.5 Pemberian EG Menurunkan PDGFA pada sel HepG2.....	46
5.6 Pemberian EG Menurunkan Ekspresi CYGB pada sel HepG2.....	47
5.7 Pemberian EG menurunkan viabilitas dan proliferasi sel Hep G2.....	47
5.8 Hubungan ekspresi protein CYGB dan proliferasi dan hubungan ekspresi CYGB dengan viabilitas sel HepG2.....	48
5.9 Hubungan ekspresi protein Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2 dan Hubungan ekspresi Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2.....	49
5.10 Hubungan ekspresi protein PDGFA dengan proliferasi sel HepG2 dan Hubungan ekspresi protein PDGFA dengan viabilitas sel HepG2	49
5.11 Hubungan ekspresi protein Nrf2 dan PDGFA.....	50
5.12 Hubungan ekspresi protein CYGB dan Nrf2.....	50
5.13 Hubungan ekspresi protein PDGFA dan CYGB	50
5.14 Kelebihan Penelitian	51
5.15 Keterbatasan Penelitian	51
 BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN	 52
6.1 Kesimpulan.....	52
6.2 Saran	52
 DAFTAR PUSTAKA.....	 53
 LAMPIRAN.....	 59

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Taksonomi tanaman gambir.....	7
Tabel 4.1 Rerata viabilitas fibroblas setelah 24, 48, dan jam pemaparan berbagai konsentrasi DMSO.....	34
Tabel 4.2 Kadar protein total sel Hep G2 kelompok kontrol dan perlakuan	36
Tabel 4.3 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan proliferasi sel Hep G2.....	42
Tabel 4.4 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan viabilitas sel Hep G2.....	43
Tabel 4.5 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan Nrf2, CYGB dengan PDGFA, dan Nrf2 dengan PDGFA.....	43

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 A dan B.Tanaman gambir, C. Ranting dan daun gambir, D. Bunga gambir, E. Getah gambir, F. Ekstrak etanol gambir.....	8
Gambar 2.2. Kandungan senyawa kimia dari <i>Uncaria gambir</i>	9
Gambar 2.3. Jalur persinyalan sel yang berperan dalam patogenesis HCC.....	11
Gambar 2.4. Struktur protein Nrf2	13
Gambar 2.5. Struktur protein KEAP1 yang mengandung 5 domain.....	14
Gambar 2.6. Regulasi Nrf2 yang berlangsung melalui berbagai tahap.	14
Gambar 2.7. Jalur Keap1-Nrf2-ARE pada <i>non-stressed, oxidative stress state</i> dan HCC.	15
Gambar 2.8. Hubungan jalur persinyalan PDGF - PDGFR dengan progresivitas dan metastasis tumor.	16
Gambar 2.9. Struktur protein CYGB.	18
Gambar 2.10. Dugaan fungsi onkogenik dan aktivitas tumour suppresor dari Cygb.	19
Gambar 3.1 Larutan stok EG 4000 µg/mL yang telah dilarutkan dengan DMSO 0,25 %.....	24
Gambar 4.1 Hasil kultur sel HepG2 selama 4 hari berturut-turut.....	33
Gambar 4.2 Pengaruh pemberian DMSO terhadap rerata viabilitas sel Hep G2	34
Gambar 4.3. Kurva dosis-respons untuk penentuan nilai IC ₅₀ EG.	35
Gambar 4.4 Kadar Nrf2 sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol.....	37
Gambar 4.5 Kadar protein PDGFA sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol	38
Gambar 4.6 Kadar CYGB sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol.....	39
Gambar 4.7.1 dan 2 Ekspresi CYGB pada pewarnaan immunofluorescence.....	40
Gambar 4.8 Pengaruh Penambahan EG Berbagai Konsentrasi terhadap proliferasi sel Hep G2	41
Gambar 4.9 Analisis korelasi antara viabilitas sel HepG2 dengan proliferasi sel HepG2.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Identifikasi/Determinasi Tumbuhan Gambir.....	59
Lampiran 2. Analisis SPSS Uji IC ₅₀ Sel HepG2 terhadap EG berbagai konsentrasi pada waktu 48 Jam.....	60
Lampiran 3 Kurva dosis respon IC ₅₀ , Kurva standar BSA, Proses pembuatan getah gambir	62
Lampiran 4. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein CYGB.....	63
Lampiran 5. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein Nrf2.....	65
Lampiran 6. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein PDGFA.....	68
Lampiran 7. Hasil Analisis Statistik Proliferasi HepG2.....	70
Lampiran 8. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Viabilitas dan Proliferasi sel HepG2.....	74
Lampiran 9. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara CYGB dan Proliferasi sel HepG2.....	75
Lampiran 10. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Nrf2 dan Proliferasi sel HepG2.....	76
Lampiran 11. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara PDGFA dan Proliferasi sel HepG2...	77
Lampiran 12. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara CYGB dan Viabilitas sel HepG2.....	78
Lampiran 13. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Nrf2 dan Viabilitas sel HepG2.....	79
Lampiran 14. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara PDGFA dan Viabilitas sel HepG2...	80
Lampiran 15. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara protein CYGB dan Nrf2.....	81
Lampiran 16. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Ekspresi Protein PDGFA dengan Nrf2	82
Lampiran 17. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Ekspresi Protein PDGFA dengan CYGB.....	83
Lampiran 18 Bukti Acceptance Manuskrip Artikel.....	84
Lampiran 19 Bukti Submit dan Presentasi di seminar Nasional	85
Lampiran 20 Riwayat Hidup	86
Lampiran 21 Manuskrip Publikasi	87

DAFTAR SINGKATAN

APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARE	<i>Antioxidant Response Element</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer 2</i>
BTB	<i>Bric-A-Brac</i>
bZIP	<i>Basic Regio-Leucin Zipper</i>
CNC	<i>Cap'n'collar</i>
CTR	<i>C-Terminal Region</i>
CYGB	<i>Cytoglobin</i>
DOX	<i>Doxorubicin</i>
EG	<i>Ekstrak Etanol Gambir</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>
EpRE	<i>Element Electrophile Response Element</i>
GADD45	<i>DNA Damage Inducible Protein</i>
GBP	<i>Guanylate-Binding Protein</i>
GSK-3b	<i>Glycogen Synthase Kinase-3b</i>
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
Hb	<i>Hemoglobin</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus (HCV).</i>
HCC	<i>Hepatocellular Carcinoma</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF 1 alfa	<i>Hypoxia-Inducible Factor-1 Alfa</i>
HO-1	<i>Hem Oksigenase-1</i>
HSC	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
IC50	<i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IGFR	<i>Insulin-Like Growth Factor Receptor;</i>
IVR	<i>Intervening Region</i>
KEAP 1	<i>Kelch Elch-Like-ECH-Associated Protein 1</i>
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MAPK	<i>Ras/ Mitogen- Activated Protein Kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
Mb	<i>Mioglobin</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
Neh	<i>Nrf2-ECH Homology</i>
NF-Kb	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer Of Activated B Cells</i>
Ngb	<i>Neuroglobin</i>
Nrf2	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>

PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factors</i>
PDGFA	<i>Platelet-Derived Growth Factor Sub Unit A</i>
PI3K,	<i>Phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PI3K-AK	<i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
RNS	<i>Reactive Nitrogen Reactive (RNS)</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>
RXR α	<i>Retinoic X Receptor Alpha</i>
sMAF	<i>Small V-Mafmusculoaponeurotic Fibrosarcoma</i>
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
Sp1	<i>Specificity Protein 1</i>
STAP	<i>Stellate Cell Activation-Associated Protein</i>
TERC	<i>Telomerase RNA Component</i>
TERT	<i>The Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TGF- β 1	<i>Transforming Growthfactor-B</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 1</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
β TrCP	<i>Ubiquitin Ligase B-Transducin Repeat-Containing Protein</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Karsinoma hepatoseluler (*hepatocellular carcinoma*, HCC) merupakan penyakit neoplasma ganas primer hepar tersering, yang terdiri dari sel menyerupai hepatosit dengan derajat diferensiasi yang bervariasi.^{1, 2} Karsinoma hepatoseluler sudah menjadi masalah kesehatan global, merupakan kanker kelima terbanyak di dunia (5,4% dari semua jenis kanker) dan penyebab kematian ketiga tertinggi akibat kanker.^{1, 3, 4}

Karsinoma hepatoseluler adalah penyakit kanker terbanyak nomor dua pada laki-laki di Indonesia, sebesar 12,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 7,6 per 100.000 penduduk (Kementerian Kesehatan RI, 2019).⁵ Pengobatan kanker dengan mengangkat jaringan kanker melalui pembedahan, kemoterapi dan radioterapi masih belum memberikan hasil yang optimal.^{6, 7}

Pemahaman menyeluruh tentang patogenesis molekuler HCC dan strategi terapi baru sangat dibutuhkan. Disregulasi *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf2) berperan dalam patogenesis HCC. Peningkatan Nrf2 menyebabkan efek merugikan yang mendukung proliferasi dan kelangsungan hidup HCC.⁶ Penelitian Zhang dkk 2016 menunjukkan bahwa Nrf2 mempromosikan proliferasi sel HCC baik secara *invitro* maupun *invivo*, yang berhubungan dengan siklus sel pada lini sel HCC.⁷

Gambir (*Uncaria gambir* [Hunter] Roxb) adalah tanaman spesifik Indonesia dengan penghasil terbesar adalah Sumatera Barat. Gambir mengandung flavonoid, khususnya katekin dengan kadar yang tinggi, yang mempunyai fungsi sebagai antikanker^{8, 9}, antioksidan,¹⁰ antifibrosis,^{10, 11} antimikroba, dan antiseptik.¹² Senyawa katekin dari tanaman gambir terbukti mempunyai efek antikanker dengan menghambat proliferasi sel dan menginduksi apoptosis dengan memodulasi ekspresi *caspase-3*, *-8*, *-9*, dan *p53*.^{9, 13} Woo dkk mengemukakan bahwa senyawa polifenol dapat menginhibisi Nrf2 sehingga tidak terjadi sintesis enzim antioksidan yang berakibat pada peningkatan sensitivitas sel kanker terhadap terapi, mengurangi ukuran tumor dan kematian sel.¹⁴

Jusman dkk pada analisis *in silico* dengan *molecular docking* mendapatkan bahwa senyawa dalam tanaman gambir, yaitu *neooxogambirtannin*, *procyanidin B2* dan gambiriin A1 dapat berikatan dengan *platelet-derived growth factor* sub unit A (PDGFA).¹⁵ Pada HCC, PDGF dikaitkan dengan prognosis buruk dan tingginya tingkat metastasis. Interaksi PDGFA dan reseptornya menyebabkan respon seluler seperti proliferasi dan migrasi melalui jalur persinalan P13K/AKT dan MEK.^{16, 17}

Peran Nrf2 dalam meningkatkan ekspresi PDGF subunit A melalui rekrutmen *specificity protein 1* (Sp1), yang menyebabkan aktivasi jalur AKT/p21 dan progresi siklus sel dari HCC.³ Zhang dkk 2015, dan Liu dkk 2016 mendapatkan bahwa kadar protein Nrf2 lebih tinggi pada lini sel HCC dibandingkan dengan lini sel hepatosit normal.^{3, 7}

Cytoglobin (CYGB) adalah *stellate cell activation-associated protein* (STAP), yang terutama diekspresikan di HSC (*hepatic stellate cells*).^{18, 19} Proliferasi sel yang tinggi pada sel kanker dapat memicu kondisi hipoksia. Akibatnya, sel memberikan respons melalui stabilnya protein *hypoxia-inducible factor-1 alfa* (HIF-1alfa) yang kemudian akan bertranslokasi ke inti, berdimer dengan subunit-beta membentuk protein HIF-1. HIF-1 merupakan faktor transkripsi untuk sintesis protein yang diperlukan pada adaptasi terhadap hipoksia. Salah satu protein yang berada dibawah regulasi HIF-1 adalah CYGB.¹⁹ CYGB berperan antara lain untuk suplai oksigen yang mendukung pembentukan energi di mitokondria. Xinarianos dkk melaporkan bahwa pemulihan CYGB pada lini sel kanker menghambat migrasi, invasi, dan pertumbuhan sel kanker.¹⁹ CYGB diduga mempunyai peran bimodal yaitu sebagai penekan tumor dalam keadaan normoksia, serta fungsi onkogenik yang menyebabkan kemoresistensi, dan perkembangan sel kanker.²⁰ Studi oleh Lv dkk membuktikan bahwa peningkatan ekspresi CYGB dapat menekan proliferasi sel kanker.²¹ Studi oleh Kawada dkk 2020 pada hewan model tikus karsinoma hepatoseluler menggunakan *diethylnitrosamin*, menemukan bahwa deplesi CYGB mendukung perkembangan kanker.²²

Penelitian Wardana dkk⁹ dan Sari dkk⁸ menunjukan bahwa ekstrak etanol gambir (EG) mempunyai aktivitas sebagai antikanker. Penelitian Amalia et al membuktikan bahwa EG meningkatkan ekspresi CYGB dan proliferasi fibroblas

keloid dibandingkan yang tidak diberikan EG, namun lebih rendah dibandingkan fibroblas non keloid.²³ Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk melihat pengaruh EG terhadap viabilitas sel Hep G2 dan korelasinya terhadap ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA.

1.2. Rumusan masalah

Karsinoma hepatoseluler adalah masalah kesehatan global dengan tatalaksana yang belum optimal. Pada karsinoma hepatoseluler terjadi peningkatan CYGB yang dikaitkan dengan peningkatan proliferasi sel kanker. Pada HCC juga terjadi peningkatan Nrf2 yang akan berikatan dengan Sp1 sehingga terjadi peningkatan PDGFA. Hal ini menyebabkan peningkatan proliferasi sel kanker. Studi sebelumnya membuktikan EG berperan sebagai anti kanker dan pada analisis *in silico* EG memiliki afinitas kuat terhadap PDGFA. Oleh karena itu, disusun rumusan masalah bagaimana pengaruh EG terhadap regulasi proliferasi sel HepG2 yang dinilai dari ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA.

1.3. Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Menganalisis pengaruh pemberian EG terhadap viabilitas sel Hep G2, ekspresi CYGB, Nrf2 dan PDGFA

1.3.2 Tujuan khusus

1. Melakukan optimasi kadar EG yang dapat menghambat viabilitas sel Hep G2 serta nilai IC_{50} dengan uji MTT.
2. Menganalisis pengaruh pemberian EG terhadap ekspresi CYGB sel HepG2
3. Menganalisis pengaruh pemberian EG terhadap ekspresi Nrf2 sel HepG2
4. Menganalisis pengaruh pemberian EG terhadap ekspresi PDGFA sel HepG2
5. Menganalisis pengaruh pemberian EG terhadap proliferasi sel HepG2
6. Menganalisis korelasi antara viabilitas dengan proliferasi sel HepG2
7. Menganalisis korelasi antara ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan viabilitas dan proliferasi sel HepG2
8. Menganalisis korelasi antara ekspresi Nrf2 dengan CYGB, antara ekspresi Nrf2 dengan CYGB, antara ekspresi CYGB dengan PDGFA

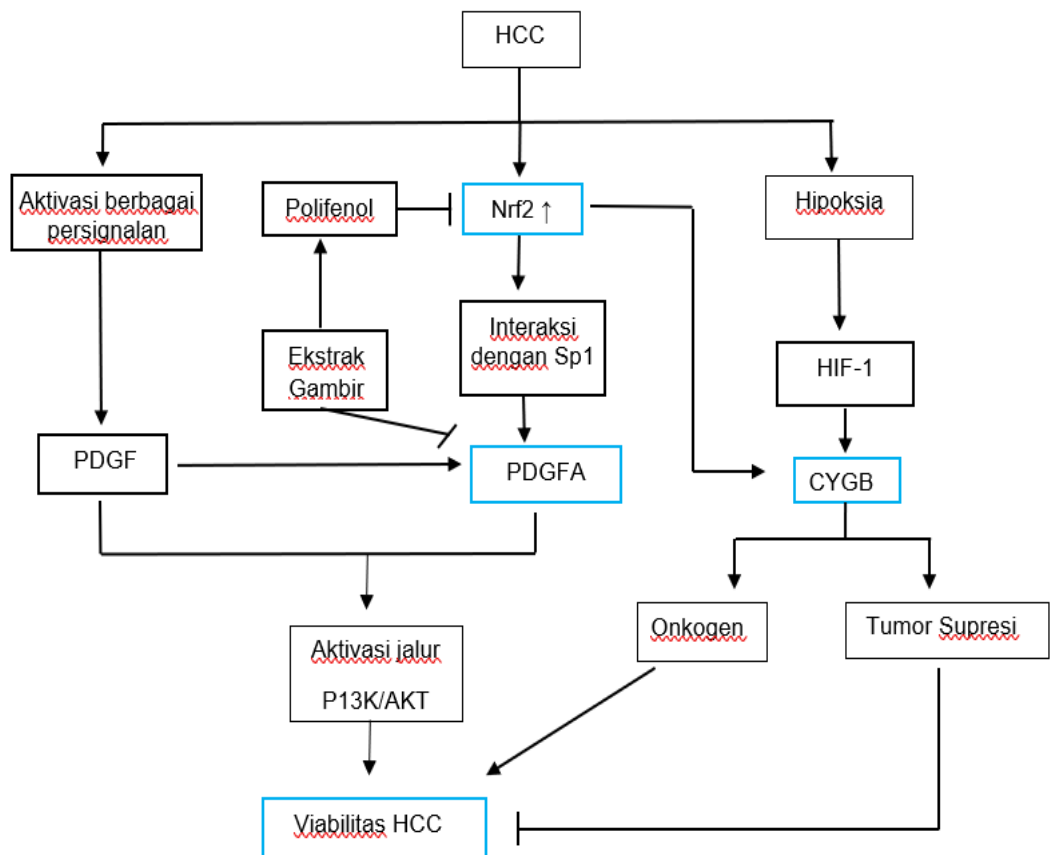
1.4 Hipotesis penelitian

1. Pemberian EG dapat menurunkan proliferasi dan viabilitas sel HepG2.
2. Pemberian EG dapat menurunkan ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA.
3. Terdapat korelasi antara viabilitas dan proliferasi sel HepG2.
4. Terdapat korelasi antara ekspresi CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan viabilitas dan proliferasi sel HepG2
5. Terdapat korelasi antara ekspresi Nrf2 dengan CYGB, antara ekspresi Nrf2 dengan CYGB, antara ekspresi CYGB dengan PDGFA

1.5 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai dasar penelitian terkait peran EG sebagai kandidat antikanker, dan mekanisme molekuler dari EG pada HCC.

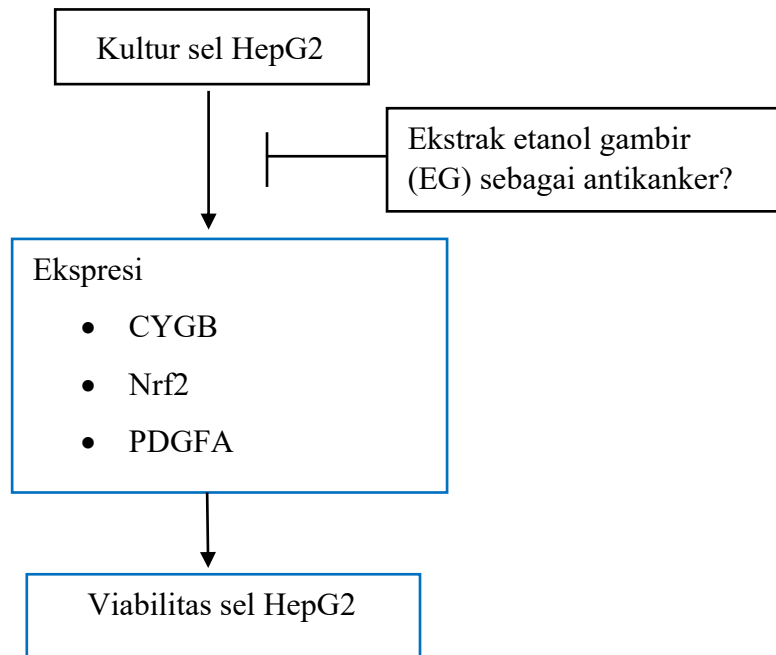
1.6 Kerangka teori



Keterangan :

- : Pengaruh positif
- | : Pengaruh inhibisi
- : Variabel yang diteliti

1.7 Kerangka konsep



Keterangan:

- : Pengaruh positif
—| : Pengaruh inhibisi
□ : Variabel yang diteliti

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

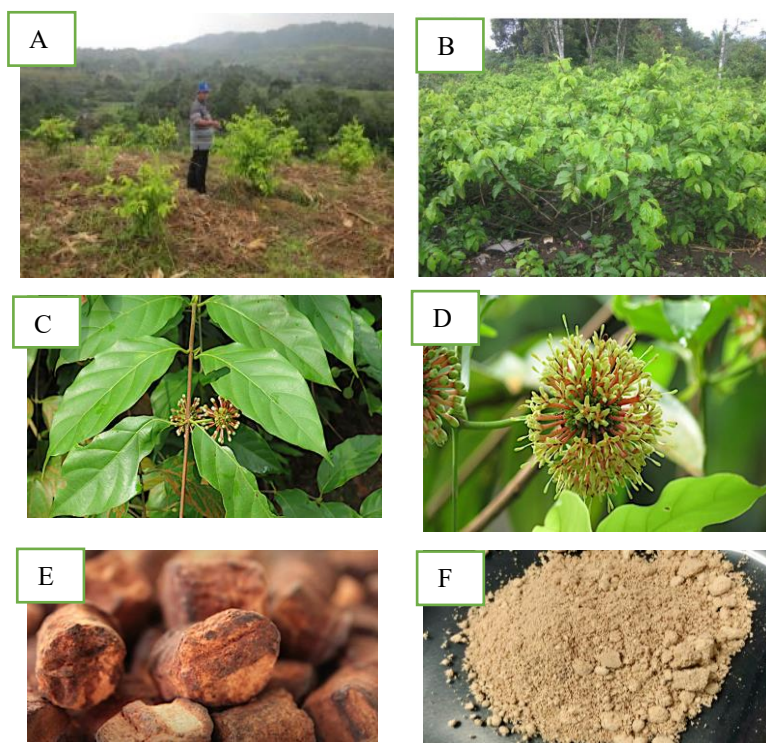
2.1 Tanaman gambir

Tanaman gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) berasal dari Asia Tenggara, khususnya Indonesia dan Malaysia.²⁴⁻²⁶ Di Indonesia, gambir merupakan komoditas perdagangan yang dimulai pada awal abad ke-19.²⁷ Saat ini, Indonesia merupakan pemasok 80% komoditas gambir di pasar dunia.^{24, 28} Gambir merupakan salah satu komoditas perkebunan yang tersebar di beberapa wilayah terutama di pulau Sumatera yaitu Sumatera Barat, Riau, Sumatera Utara, Sumatera Selatan dan Aceh.²⁸ Tanaman gambir termasuk dalam *Rubiaceae family*. Taksonomi tanaman gambir ditampilkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Taksonomi tanaman gambir^{27, 28}

Kingdom	<i>Plantae</i>
Sub Kingdom	<i>Viridiplantae</i>
Super Divisi	<i>Embryophyta</i>
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Kelas	<i>Angiospermae</i>
Sub Kelas	<i>Asteranae</i>
Order	<i>Rubiales</i>
Famili	<i>Rubiaceae</i>
Genus	<i>Uncaria</i>
Spesies	<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.

Bunga, ranting, daun, getah, dan ekstrak etanol gambir dari tanaman gambir disajikan dalam Gambar 2.1.



Gambar 2.1 A dan B. Tanaman gambir²⁶, C. Ranting dan daun gambir, D. Bunga gambir, E. Getah gambir, F. Ekstrak etanol gambir^{24, 26}

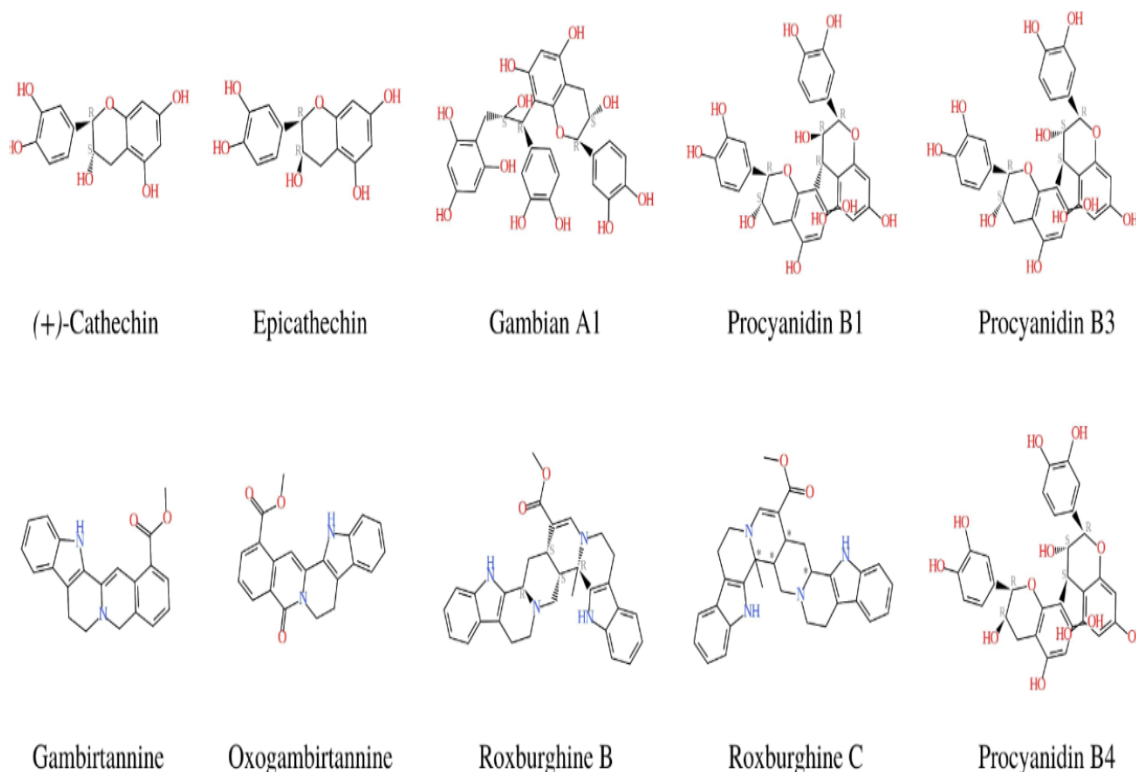
Tanaman gambir sejak lama telah digunakan sebagai obat tradisional untuk meredakan penyakit seperti demam, diare, sakit kepala, pilek, batuk, radang saluran kemih, sakit gigi dan sakit perut.²⁹

Gambir mengandung senyawa polifenol dengan kandungan utama flavonoid(+)- katekin yang mencapai 40-80 % berat ekstrak kering, selain itu juga terdapat epikatekin 1,5 %, prosianidin B1, prosianidin B3 dan gambiriin yang masing masing sebesar 1 %.³⁰

Pada studi *in vitro*, katekin memiliki efek langsung sebagai antioksidan dengan membersihkan radikal bebas serta secara signifikan menghambat *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen reactive* (RNS).²⁹ Penelitian Ningsih et al menjelaskan bahwa ekstrak gambir terbukti mampu menekan perkembangan fibrosis hati melalui aktivitas fibrolisis pada dosis 262 mg/kgBB dan lebih baik dibanding fibropreventif pada dosis 65 mg/kgBB, karena mampu menekan ekspresi *tissue inhibitor of metalloproteinase 1* (TIMP-1) dan kolagen 1.³¹

Senyawa antioksidan yang terdapat pada gambir juga berperan sebagai fibropreventif dan fibrolisis pada fibrosis paru dengan menghambat *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) melalui penekanan pembentukan kolagen, dan TIMP-1.¹¹ Senyawa antioksidan serupa seperti pada gambir juga dapat melakukan penekanan stres oksidatif yang dimediasi oleh Nrf2. Desdiani dkk 2021 menyatakan bahwa gambir dapat berperan sebagai inhibitor bagi reseptor TGF- β 1 pada *cell line* A594.³²

Penelitian oleh Jusman *et al* tahun 2023 melalui pemeriksaan *in silico* dengan pendekatan *molecular docking* menunjukkan bahwa terdapat 12 senyawa bioaktif bahan kimia sebagai ligan dari ekstrak *Uncaria gambir* (Hunter) yaitu *Catechin*, *Epicatechin*, *Gambirin A1*, *Procyanidin (B1,B2,B3,B4)*, *Roxburghine (B,C)*, *Gambirtannine*, *Oxogambirtannine* yang ditunjukkan pada Gambar 2.2¹⁵ Aktivitas senyawa di dalam tanaman gambir yaitu *gambirin A1*, *procyanidin B2*, dan *neooxygambirtannine* dalam EG, dibuktikan pada uji *in silico* dapat berikatan dengan reseptor PDGFA.¹⁵



Gambar 2.2. Kandungan senyawa kimia dari *Uncaria gambir*¹⁵

Penelitian oleh Syarifah, et al ⁸ menemukan bahwa gambir mempunyai aktivitas antikanker pada sel lini kanker payudara T47D secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa gambir menghambat pertumbuhan sel kanker payudara, namun masih lebih lemah dari doxorubicin (DOX) sebagai kontrol positif. ⁸ Penemuan obat baru antikanker yang dilakukan dengan mengeksplorasi bahan alam sangat berpotensi untuk dikembangkan.

2.2 Karsinoma Hepatoseluler

2.2.1 Epidemiologi HCC

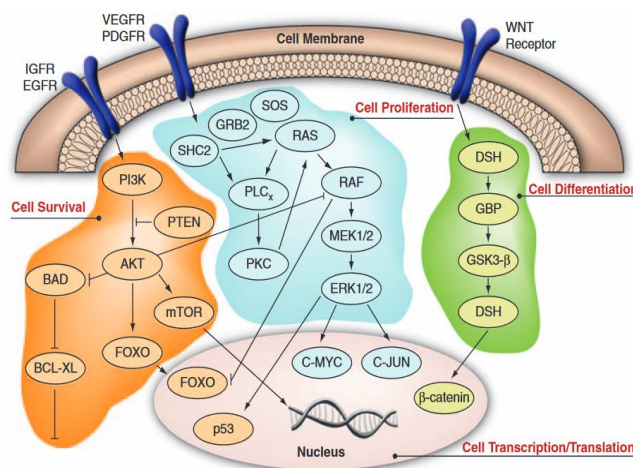
Karsinoma hepatoseluler (*hepatocellular carcinoma/HCC*) adalah kanker hati primer yang paling utama dengan jumlah lebih dari 80% dari semua keganasan hati.³³ HCC sudah menjadi masalah kesehatan global, merupakan kanker kelima terbanyak di dunia (5,4% dari semua jenis kanker) dan penyebab kematian ketiga tertinggi akibat kanker.^{1, 3, 4} Karsinoma hepatoseluler adalah penyakit kanker terbanyak nomor dua pada laki-laki di Indonesia, sebesar 12,4 per 100.000 penduduk dengan rata-rata kematian 7,6 per 100.000 penduduk (Kementerian Kesehatan RI, 2019).⁵ Etiologi dari HCC yang paling utama (80-90 %) adalah perkembangan dari sirosis, adapun faktor lainnya adalah aflatoksin B1, diabetes, asupan alkohol berlebihan, infeksi Hepatitis-B-virus (HBV) dan Hepatitis-C-virus (HCV), *non-alcoholic fatty liver disease* dan penggunaan tembakau.¹

2.2.2 Patogenesis Molekuler dari HCC

Hepatokarsinogenesis adalah proses multistep, dan melibatkan 5 faktor utama dalam molekuler patogenesisnya yaitu perubahan pola ekspresi gen dengan mutasi pada gen spesifik hati, aktivasi dari *growth factor* yang berperan dalam regulasi jalur persinyalan untuk diferensiasi sel, proliferasi, dan angiogenesis, perubahan dan mutasi epigenetik, disregulasi jalur-jalur persinyalan dalam proliferasi sel, serta peningkatan ekspresi dari target gen Nrf2 yang berperan dalam diferensiasi, metastasis, dan ukuran tumor pada HCC.³⁴

Perubahan pola ekspresi gen yang berperan dalam proliferasi sel, perkembangan siklus sel, apoptosis dan metastasis yaitu *p53*, *adenomatous polyposis coli* (APC), *breast cancer 1* (BRCA1), *breast cancer 2* (BRCA2), *Rb*, *Ras* dan *β -catenin*.³⁵ Faktor lain yang juga berperan dalam patogenesis HCC adalah

aktivasi dari *growth factor* yang berperan dalam regulasi jalur persinyalan (*insulin-like growth factor* (IGF), *epidermal growth factor* (EGF), dan *hepatocyte growth factor* (HGF)), jalur yang terkait dalam diferensiasi sel (*Wnt*, *Landak*, *Notch*) dan jalur persinyalan yang berperan dalam angiogenesis (*vascular endothelial growth factor*, VEGF).³⁶ Jalur persinyalan sel yang berperan dalam patogenesis HCC ditunjukkan pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Jalur persinyalan sel yang berperan dalam patogenesis HCC³⁶

Faktor yang berperan dalam proses karsinogenesis HCC yang ketiga yaitu adanya mutasi dan perubahan epigenetik. Pada HCC dilaporkan sekitar 30-60% menunjukkan mutasi pada *telomerase RNA component* (TERC) and *the telomerase reverse transcriptase* (TERT).³⁷ Hal tersebut menyebabkan down regulasi dari p53 atau mutasi dari p53 yang akan mengaktivasi jalur onkogenik dari HCC.³⁸ Perubahan epigenetik lainnya yang berperan yaitu adanya disregulasi dari p14/ARF, dan DNA *damage inducible protein* (GADD45)³⁹, dan pada kasus special dari HCC terjadi hipometilasi dan hipermetilasi dari situs spesifik. DNA metilasi pada situs spesifik menyebabkan *instabilitas genetic* dan *silencing* dari gen tumor supresor tumor.⁴⁰

Disregulasi dari jalur persinyalan, juga berperan dalam perkembangan HCC yaitu *Wnt/β-catenin*, *Ras*, *p14ARF/P53*, *p16INK4A/Rb*, *transforming growthfactor-β* (TGF-β) dan *PTEN/Akt*.⁴¹ Jalur persinyalan dari *Wnt/β-catenin* terlibat dalam proliferasi sel dan perkembangan sel kanker, overaktivasi dari jalur ini menyebabkan perkembangan sel kanker pada manusia.⁴² Jalur persinyalan dari

Ras/ mitogen- activated protein kinase (MAPK) dan *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt kinase* terjadi hiperaktivasi pada 50 % dari HCC.⁴³

Penelitian terbaru menunjukkan peran potensial dari target Nrf2 dalam cedera, peradangan, dan proses hepatokarsinogenesis. Hepatokarsinogenesis yang diinduksi HCV menyebabkan fosforilasi dan translokasi Nrf2 oleh MAPK, casein kinase 2 dan PI3K, yang mengatur gen Nrf2-ARE. Hal ini menyebabkan *up-regulasi* dari protein Maf.⁴⁴ Pada penelitian oleh Gong, *et al* sel HepG2 yang diinduksi oleh CYP2E1 menunjukkan *up-regulasi* mRNA Nrf2 yang juga disertai *up-regulasi* dari berbagai protein *downstream* (GCLC dan HO-1).⁴³

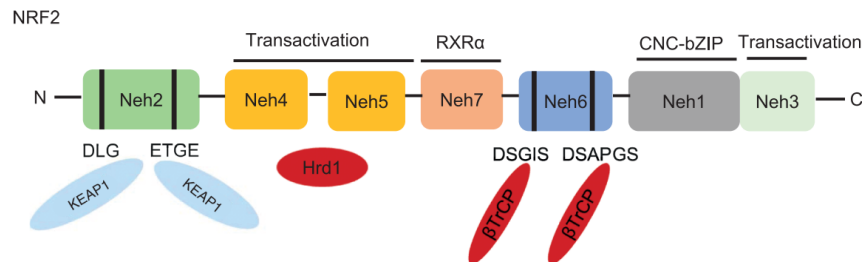
2.3 Nrf2

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) adalah faktor transkripsi yang diketahui sangat berperan dalam metabolisme xenobiotik dan respons terhadap *reactive oxygen species* (ROS)^{45, 46} Nrf2 diekspresikan secara luas dalam sel mamalia. Pada tahun 1991, diketahui bahwa stres oksidatif dapat mengaktifkan gen antioksidan melalui *antioxidant response element* (ARE).⁴⁷

Penelitian terakhir mengungkapkan bahwa Nrf2 mengatur berbagai proses melalui ARE dan *element electrophile response element (EpRE)* yang berperan dalam meregulasi respons endogen terhadap berbagai stres intrinsik dan ekstrinsik.^{48, 49} Studi terbaru juga mengidentifikasi dan menjelaskan beberapa fungsi baru dari Nrf2 selain kemampuan dalam merespons stres oksidatif. Nrf2 juga berperan dalam regulasi inflamasi, autofagi, metabolisme, proteostasis dan *unfolded protein response* (UPR), biogenesis mitokondria, serta juga dikaitkan dengan proses karsinogenesis.^{45, 46, 50, 51} Hal ini menunjukkan bahwa Nrf2 merupakan faktor transkripsi yang bersifat pleiotropik.

2.3.1 Struktur protein Nrf2

Nrf2 termasuk ke dalam famili protein *Cap'n'collar* (CNC) dan memiliki domain CNC yang unik yang berikatan dengan *basic regio-leucin zipper* (CNC-bZIP) motif.⁴⁶ Struktur protein Nrf2 ditampilkan pada Gambar 2.4.



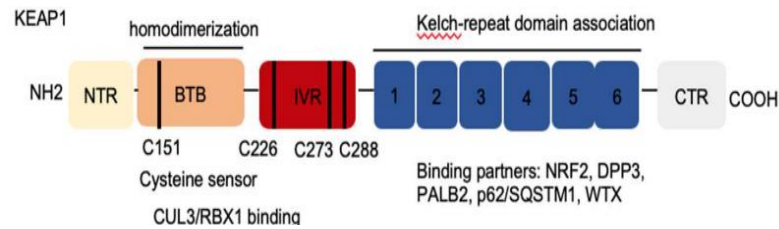
Gambar 2.4. Struktur protein Nrf2 yang mempunyai 7 domain fungsional *Nrf2-ECH* homology 1-7 (Neh1- Neh7).^{45, 46}

Protein Nrf2 mempunyai 7 domain fungsional dengan fungsi berbeda dalam meregulasi aktivitas transkripsi Nrf2, yaitu domain 1-7 *Nrf2-ECH* homology (Neh1-Neh7). Domain Neh1 mengandung regio CNC-bZIP yang *well-conserved*, dapat berheterodimer dengan protein onkogen *musculoaponeurotic fibrosarcoma* (sMAF), berfungsi untuk mengenali ARE dan/EpRE. Regio CNC-bZIP ditemukan pada berbagai spesies dan sangat vital untuk fungsi Nrf2⁵¹

Neh2 mempunyai domain N-terminal yang merupakan domain tempat terikatnya Nrf2 kepada domain regulator negatif dari *Kelch-like-ECH-associated protein 1* (KEAP1) yang terdiri dari motif ETGE dan motif DLG, terutama berinteraksi dengan domain (KEAP1) untuk ubiquitinasi dan degradasi Nrf2.⁴⁵ Domain Neh3-5 berfungsi sebagai domain untuk aktivasi transkripsi dengan melakukan ikatan dengan komponen transkripsi. Domain Neh6 berperan dalam degradasi Nrf2, yang tidak tergantung Keap1, dalam sel yang mengalami stres oksidatif, terdiri dari dua *redox-independent degrons* DSGIS dan DSAPGS yang berikatan dengan *E3 ubiquitin ligase β-transducin repeat-containing protein* (βTrCP).^{45, 46} Domain Neh7 berperan menekan aktivitas Nrf2 dengan melakukan interaksi dengan *retinoic X receptor alpha* (RXRα). Semua domain ini menjaga stabilitas Nrf2 dan aktivasi transkripsi dari gen target pada level bertingkat, yang meliputi transkripsi, paska-transkripsi dan regulasi paska-translasi sebagai respon terhadap berbagai stres.⁴⁵

2.3.2. Struktur protein KEAP1

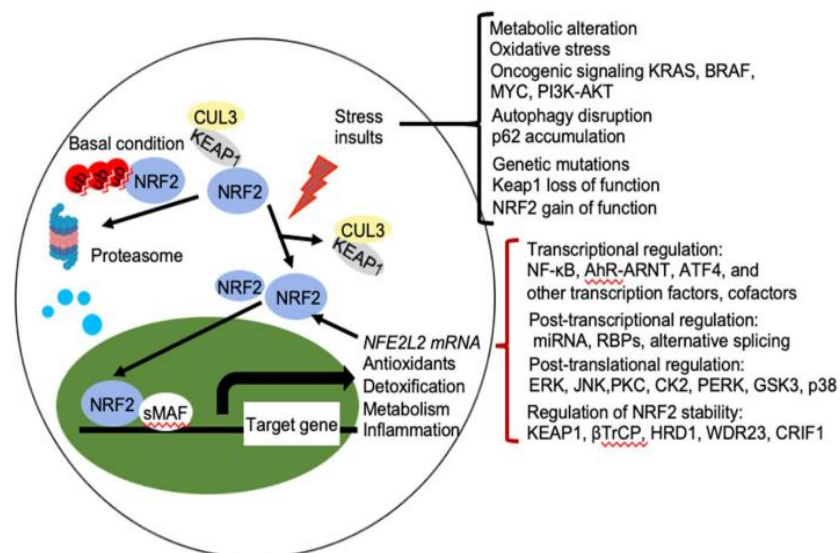
Protein KEAP1 yang mengandung 5 domain, yaitu domain amino terminal region (NTR); *broad complex, tramtrack, bric-a-brac* (BTB); *intervening region* (IVR), 6 *Kelch-repeat domain association*; dan *C-terminal region* (CTR) ditampilkan pada Gambar 2.5^{45, 52, 53}



Gambar 2.5. Struktur protein KEAP1 yang mengandung 5 domain⁴⁵

2.3.3. Regulasi Nrf2

Regulasi Nrf2 terjadi melalui berbagai tahap yaitu regulasi tahap transkripsi, regulasi paska transkripsi, regulasi paska translasi, dan regulasi stabilitas Nrf2 yang dapat distimulasi oleh beberapa stresor seperti perubahan metabolisme; stres oksidatif, persinyalan onkogen, gangguan autofagi, dan mutasi genetik yang ditampilkan pada Gambar 2.6. berikut ini⁴⁵



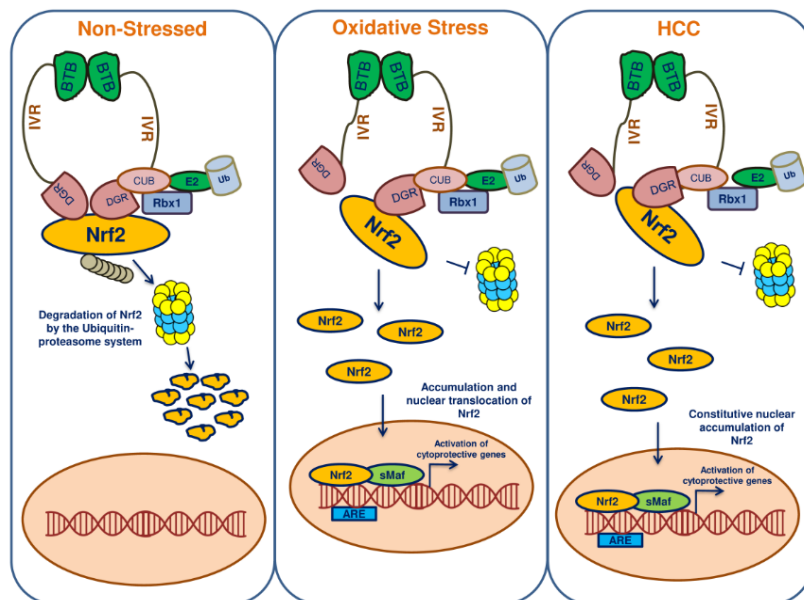
Gambar 2.6. Regulasi Nrf2 yang berlangsung melalui berbagai tahap.⁴⁵

2.3.4 Nrf2 pada HCC

Ekspresi Nrf2 pada HCC dapat digunakan sebagai faktor prognostik independen dikarenakan keterkaitan Nrf2 dengan kelangsungan hidup sel⁷, faktor patologi klinik⁷, diferensiasi, ukuran tumor, proliferasinya yang dibuktikan dengan ekspresi Bcl-xL dan matriks metaloproteinase-9. Pada kondisi fisiologis atau non-stres, KEAP1 berperan sebagai regulator negatif dari Nrf2, sehingga Nrf2 tetap di sitoplasma, dan terjadi degradasi melalui sistem ubiquitin-proteosomal.

Pada keadaan stres oksidatif, ekspresi Nrf2 meningkat. Residu sistein pada domain KEAP1 IVR berperan sebagai sensor redoks, dan Nrf2 akan dilepaskan dari kompleks dengan KEAP1 tersebut bila teroksidasi. Selanjutnya terjadi fosforilasi Nrf2 diikuti translokasi Nrf2 ke inti. Di dalam inti terjadi dimerisasi dengan *small v-mafmusculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog* (sMaf). Heterodimer Nrf2-sMaf ini akan terikat pada fragmen DNA yang disebut sebagai *antioxidant responsive element* (ARE) atau *electrophile responsive element* (EpRE).⁴⁹

Pada HCC, aktivasi Nrf2 terjadi secara terus menerus yang menyebabkan proliferasi sel dan resistensi obat.³⁴ Aktivasi jalur Keap1-Nrf2-ARE pada keadaan basal (*non-stressed*), *oxidative stress state* dan HCC ditampilkan pada Gambar 2.7.³⁴



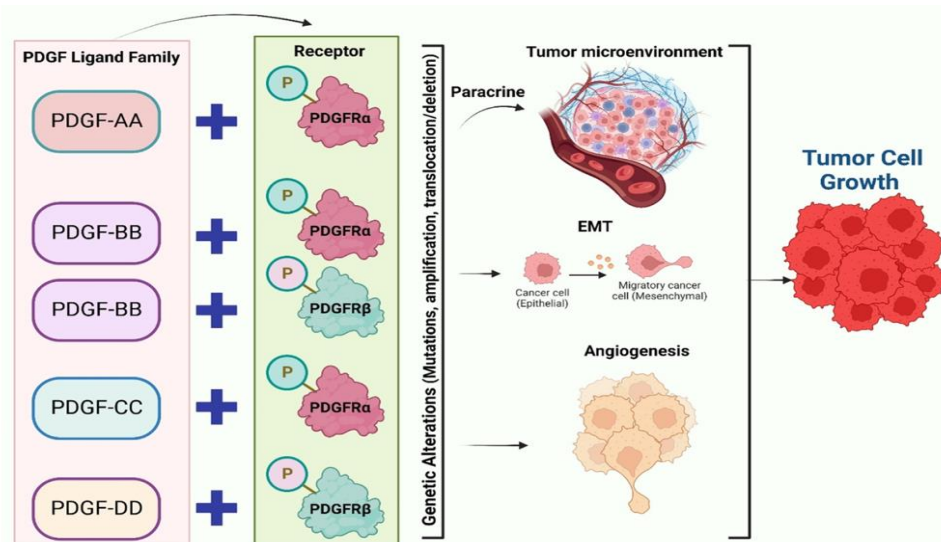
Gambar 2.7. Jalur Keap1-Nrf2-ARE pada *non-stressed*, *oxidative stress state* dan HCC.³⁴

2.4 Platelet-derived growth factors

Platelet-derived growth factors (PDGF) adalah protein dimerik yang dihubungkan oleh 2 jembatan sistein.⁵⁴ Terdapat total 5 protein PDGF aktif yaitu 4 homodimer (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C and PDGF-D), dan satu heterodimer yaitu PDGF-AB. PDGF diekspresikan dalam keadaan normal oleh berbagai jenis sel yaitu fibroblas, sel neuron, sel epitel kornea, makrofag, sel endotel, sel otot polos, dan trombosit.^{55, 56}

PDGF menjalankan fungsi biologisnya dengan mekanisme autokrin atau parakrin.⁵⁴ Semua PDGF tersusun dari domain yang *conserved* yaitu VEGF/ PDGF *homology domain* yang terlibat dalam pembentukan dimer PDGF melalui jembatan disulfida intra dan inter molekul. Terdapat 4 gen PDGF yang berkaitan dengan VEGF yaitu PDGF-A,-B,-C-D yang mengkode PDGF.⁵⁴

Beberapa kanker, termasuk glioma, *Kaposi's sarcoma*, kanker prostat, kanker ovarium, kanker ginjal dan kanker pankreas telah dikaitkan dengan peningkatan tingkat PDGF dan PDGFR.^{57, 58} Pada beberapa jenis karsinoma, PDGF menstimulasi pertumbuhan tumor melalui berbagai perubahan selular dan molekular yaitu melalui persinyalan secara parakrin yang berperan dalam angiogenesis, lingkungan mikro tumor dan mempromosikan *epithelial mesenchymal transition* (EMT). Peran jalur persinyalan dari PDGF/PDGFR secara autokrin atau parakrin terlihat pada gambar 2.8.⁵⁴



Gambar 2.8. Hubungan jalur persinyalan PDGF - PDGFR dengan progresivitas dan metastasis tumor.⁵⁴

2.5 Kaitan Nrf2 dan PDGF

Nrf2 berperan dalam proliferasi sel serta memiliki keterkaitan dengan PDGF.³ PDGF berperan dalam angiogenesis, proliferasi dan diferensiasi sel serta metastasis. Dalam kasus keganasan hepatoseluler, PDGF telah lama dikaitkan dengan prognosis buruk dan tingginya tingkat metastasis. Interaksi PDGFA dan reseptornya menyebabkan respon seluler seperti proliferasi dan migrasi melalui jalur persinyalan P13K/AKT dan MEK. Penekanan persinyalan PDGF telah ditunjukkan dapat mengurangi pertumbuhan dan metastasis dari HCC pada manusia.^{16, 17} Mekanisme yang mengatur Nrf2 dan PDGF sama-sama terganggu dalam proses perkembangan tumor pada HCC. Nrf2 akan mengalami upregulasi, dan akan mempromosikan proliferasi sel HCC melalui upregulasi progresi siklus sel, termasuk upregulasi PDGF. Nrf2 melakukan rekrutmen Sp1 dengan promotor PDGF dan meningkatkan ekspresi dari PDGF.⁵⁹ Oleh karena itu, sel HepG2 dapat digunakan sebagai media untuk menilai ada tidaknya peran dari Nrf2, PDGF terhadap proliferasi sel. Di sisi lain, aktivasi dari NRF2 bergantung pada aktivasi PDGFA. Temuan ini menunjukkan adanya keterkaitan antara NRF2 dan PDGF dalam proliferasi sel.³

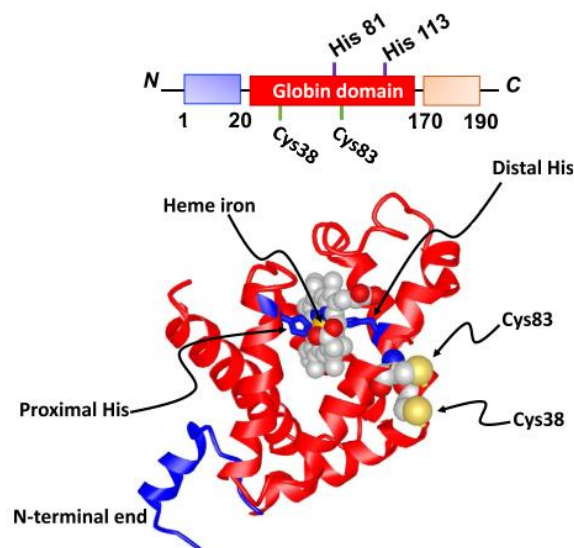
2.6 Sitoglobin

Sitoglobin (CYGB) merupakan anggota baru keluarga protein globin, setelah ditemukannya protein globin yang lain seperti hemoglobin (Hb), mioglobin (Mb) dan neuroglobin (Ngb).⁶⁰ Pada tahun 2001, Kawada et al. mengidentifikasi CYGB dalam *hepatic stellate cells* (HSC) yang berperan penting dalam perbaikan jaringan sel hati yang rusak.⁶¹ Oleh karena itu disebut sebagai *stellate cell activation-associated protein* (STAP). CYGB telah terbukti berperan penting pada pernapasan sel normal, diantaranya untuk penyimpanan oksigen, pemusnahan *reactive oxygen species* (ROS), aktivitas oksidase terminal, dan aktivitas antifibrotik.^{62, 63} Penelitian terbaru melaporkan CYGB memiliki beberapa implikasi pada kanker. Pada sebagian besar sel kanker, ekspresi CYGB pada sel diregulasi oleh hipermetilasi mengakibatkan penurunan ekspresi dan menunjukkan kontrol epigenetik⁶⁴, dan kemungkinan peran sebagai gen penekan tumor.⁶⁵ Pada

beberapa keganasan terjadi sebaliknya, upregulasi CYGB terjadi kemungkinan dikaitkan dengan adanya resistensi terhadap hipoksia.⁶⁶

2.6.1 Struktur CYGB

CYGB merupakan globin dengan 6 ikatan koordinasi (*hexacoordinate globin*), berbeda dengan Hb dan Mb yang merupakan *pentacoordinate globin*.^{20, 22, 60} Dilihat dari struktur kristalnya, CYGB merupakan homodimer yang dimediasi oleh dua subunit jembatan disulfida, sisi Cys38 dari satu monomer berikatan kovalen dengan sisi Cys83 dari monomer lainnya, dan sebaliknya. Berat molekul CYGB adalah 20.9 kDa.^{20, 67} Struktur protein CYGB tersusun dari domain globin berwarna merah menghubungkan ujung N (berwarna biru yaitu asam amino 1 sampai 20), dan ujung C terminal (berwarna oranye yaitu asam amino 170-190). His113 merupakan histidin proksimal dan His 81 merupakan histidine distal. Sistein 38 dan sistein 83 terdapat pada bagian permukaan (Gambar 2.9).⁶⁸



Gambar 2.9. Struktur protein CYGB.⁶⁸

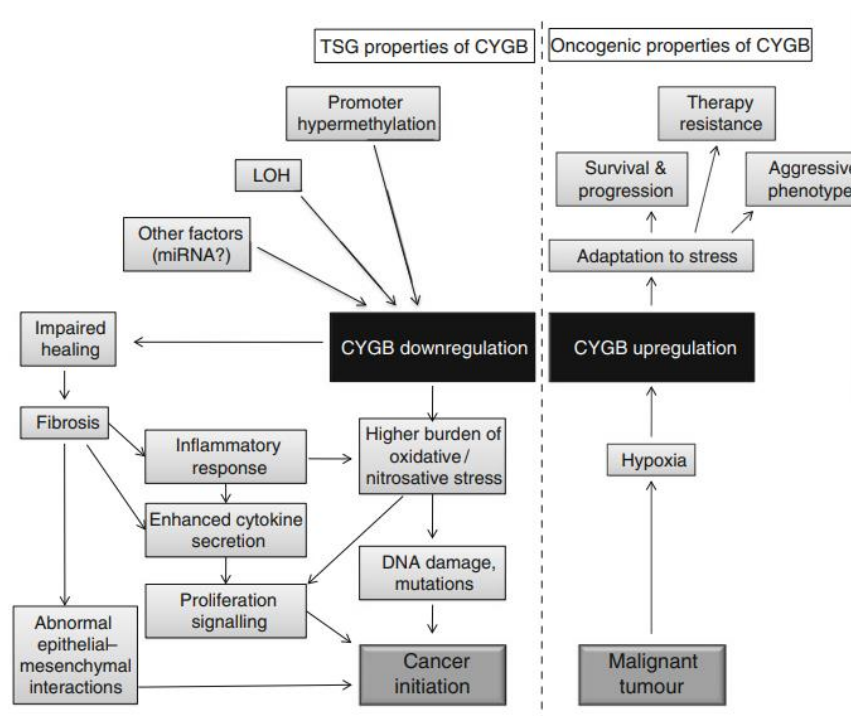
2.6.2 Peran CYGB pada kanker

Kemajuan penelitian molekuler mengenai fungsi lain dari CYGB terus berkembang yaitu kemampuannya untuk menekan pertumbuhan tumor. Hubungan dan peran CYGB pada kanker pertama kali diusulkan pada tahun 2006, berdasarkan penelitian terhadap metilasi promotor dari sampel jaringan pasien karsinoma sel

skuamosa oral. Pada penelitian tersebut dijelaskan bahwa metilasi promotor pada situs CpG meningkat dibandingkan dengan kontrol non tumor.^{68, 69}

Beberapa penelitian *in vitro* menunjukkan disregulasi ekspresi CYGB pada beberapa sel lini kanker dan adanya efek sebaliknya, yaitu ekspresi berlebihan dari CYGB. Ekspresi CYGB mengalami *up*-regulasi pada beberapa jenis kanker seperti *alveolar soft part sarcoma*, karsinoma paru, dan kanker kepala leher^{70, 71}. Oleh karena itu diduga fungsi CYGB sangat kontras dan kompleks. Baru-baru ini, peran bimodal CYGB telah diusulkan, yaitu CYGB berperan sebagai penekan tumor dalam normoksia tetapi berperilaku seperti onkogen dalam kondisi stres. Peran sitoprotektif *Cygb* dapat menyebabkan karsinogenesis atau agresivitas dengan melindungi sel-sel tumor dari cedera oksidatif.⁶⁸

Jadi dapat disimpulkan, terdapat dugaan fungsi onkogenik serta aktivitas *tumour suppressor* dari CYGB yang ditunjukkan pada Gambar 2.10.⁶⁵ Fungsi onkogenik menyebabkan kemoresistensi, perkembangan sel kanker, dan *aggressive phenotype*. Terjadinya *down*-regulasi dari CYGB juga akan menyebabkan inisiasi sel kanker.⁶⁵



Gambar 2.10. Dugaan fungsi onkogenik dan aktivitas tumour suppressor dari *Cygb*.⁶⁵

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental *in vitro* menggunakan kultur sel lini kanker Hep G2.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (FKUI), Laboratorium Gerontologi FKUI, *Stem Cells and Tissue Engineering* (SCTE), dan *Indonesian Medical Education and Research Institute* (IMERI) FKUI yang berlangsung sejak bulan Agustus 2022 hingga Juni 2023.

3.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yang digunakan adalah sel lini kanker HepG2 [HEPG2] HB-8065TM.⁷² Sampel sel dibagi ke dalam kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol adalah kelompok sel Hep G2 yang dikultur dalam medium tanpa penambahan Ekstrak Etanol Gambir (EG), sedangkan kelompok perlakuan merupakan kelompok Hep G2 yang dikultur dalam medium yang mengandung EG dengan konsentrasi berbeda. Adapun konsentrasi EG yang digunakan berdasarkan penentuan nilai IC₅₀ antara lain 500 µg/mL (setengah dari nilai IC₅₀ ; 1000 µg/mL (nilai IC₅₀) ; dan 2000 µg/mL (2 kali IC₅₀). Lama waktu kultur dan konsentrasi EG yang digunakan dalam penelitian ditentukan berdasarkan hasil optimasi serta penghitungan nilai *half maximal inhibitory concentration* (IC₅₀).

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

1. Untuk kultur sel yaitu *Biosafety Cabinet* (BSC) *Class II 1300 series A* [Thermo Scientific], inkubator CO₂ *Galaxy 170 S* [New Brunswick], *LUNA automated cell counter* [Logos Biosystem], mikrosentrifugasi [Hermle], ZOE *Flourescent cell imager* [Biorad], mikro pipet 10 µL, 100 µL, dan 1000 µL [Eppendorf], *pipettor turbo* [TPP] dan autoklaf Hiclave HVE-50 [Hirayama],

syringe with needle 3cc, 5 cc, dan 10 cc [Terumo]; syringe filter 0,22 μm , $\varnothing$ 0,33 mm [Techno Plastic Product, TPP],

2. Untuk analisis viabilitas dan proliferasi sel HepG2 berupa *Varioscan Flash* [Thermo Scientific].
3. Untuk isolasi protein dan uji kadar protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA yaitu *microplate shaker* [Biosan].
4. Untuk imunofluoresens yaitu *ZOE Flourescent cell imager* [Biorad].

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi:

1. Ekstrak Etanol Gambir yang diperoleh dari Dr. Sri Ningsih, Apt. dari Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Tradisional Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Simplisia gambir (ranting dan daun gambir) di peroleh dari Kabupaten Limapuluh Kota Propinsi Sumatra Barat.
2. Untuk kultur sampel berupa lini sel HepG2, *Dulbecco's Modified eagle medium* (DMEM) *high glucose* [Gibco], *Fetal Bovine Serum* (FBS) [Gibco], *penicillin-streptomycin* [Gibco], *amphotericin-B* [Gibco], *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS) [Gibco], *TrypLe Select* [Gibco], *trypan blue* 0.4% [Gibco], Tips (10 μL , 100 μL , 1000 μL) [NEST], tube (15 mL dan 30 mL) [TPP], T-flask (25 cm^2 dan 75 cm^2) [Biologix], *LUNA cell counting slide* [Logos Biosystem] dan *cryogenic vial* steril 2 mL [Biologix], *dimethyl sulfoxide* (DMSO) [Santa cruz]
3. Untuk analisis viabilitas dan proliferasi sel HepG2 yaitu *MTT Assay* kit [Elabscience, E-CK-A341], *dimethyl sulfoxide* - DMSO [Santa cruz] dan *96-well culture plate* [TPP].
4. Untuk isolasi protein dan uji kadar protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA yaitu *6-well culture plate* [TPP], *RIPA 10x lysis buffer* [Thermo] dan Human CYGB (Cytoglobin) ELISA Kit *plate* [Elabscience, E-EL-H2471], Human Nrf2 ELISA Kit [Thermo Fisher Scientific, EH348RB], Human PDGFA(*Platelet-derived growth factor subunit A*) ELISA Kit [FineTest, EH0511]
5. Untuk uji proliferasi sel yaitu *BrdU Cell Proliferation* ELISA Kit ab126556 [ABCAM],

6. Untuk Imunofluoresens yaitu Antibodi sitoglobin [Santa cruz], Goat anti-Mouse IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 633 [Thermo Fisher Scientific], metanol, *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* (DPBS) [Gibco], Triton X-100, Bovine serum albumin (BSA) [Sigma-Aldrich], DAPI MBD0015 [Sigma-Aldrich], dan 8-well chamber slide [Biologix].

3.5 Cara Kerja

3.5.1 Pembuatan Medium Pertumbuhan Komplit

Medium pertumbuhan komplit terdiri atas DMEM *high glucose*, 1% *penicillin-streptomycin*, dan 1% amfoterisin B, dan 10% FBS. Setelah medium pertumbuhan komplit selesai dibuat, disaring dengan menggunakan *syringe* 10 mL dan filter 0,22 µm *milipore* steril.

3.5.2 Kultur sel

Kultur sel lini kanker Hep G2 pada penelitian ini dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut: *thawing*, kultur dan subkultur, dan panen (*harvest*)

3.5.2.1 Thawing

Hep G2 yang berada dalam *cryogenic vial* dikeluarkan dari freezer -80°C atau liquid nitrogen, dengan *coolbox* sel dengan segera dibawa ke ruang kultur. Proses *thawing* harus dilakukan secara cepat, kemudian segera dipindahkan ke dalam medium komplit dengan volume sebanyak 10x lipat dari jumlah volume yang ada dalam *cryogenic vial*. Sel tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 700 g selama 10 menit, supernatannya dibuang dan sel diresuspensi kembali dengan 1 mL medium pertumbuhan komplit. Sel kemudian dihitung untuk mengetahui viabilitas sel dengan metode *trypan blue exclusion assay*. Sel kemudian ditanam di dalam flask 25cm² dengan densitas 1,0x10⁶ sel/flask di dalam 6 ml medium komplit.

3.5.2.2 Kultur dan subkultur

Kultur sel Hep G2 menggunakan medium komplit (medium yang mengandung DMEM *high-glucose* dengan penambahan 10 % FBS, 1% *amphotericin B*, 1% *penicillin-streptomycin*. Sel tersebut dikultur dalam inkubator pada kondisi standar (5% CO₂, 37°C). Pengamatan pada pertumbuhan sel dan ada tidaknya kontaminasi dilakukan setiap hari, dan pergantian medium komplit

dilakukan setiap dua sampai tiga hari. Sel HepG2 dipanen ketika sel mencapai konfluensi kurang lebih 80%.

3.5.2.3 Panen dan uji viabilitas sel

Sel kanker Hep G2 yang telah mencapai konfluensi 80 % dan tidak ada kontaminasi akan dilakukan *harvest*. Sel HepG2 bersifat adheren (menempel pada dasar) diberi sehingga *triple select* sebanyak 2-3 mL hingga menutupi permukaan sel. Proses pelepasan sel juga dapat dibantu dengan mengetuk bagian dasar flask. Setelah itu, sel diinkubasi dalam inkubator CO_2 selama 7-10 menit. Untuk melihat apakah semua sel sudah terlepas atau belum dari dasar flask, digunakan *inverted microscope*. Sel yang telah terlepas ditandai dengan mengapungnya sel di permukaan media. *Harvesting* dilakukan dengan memindahkan suspensi sel dari dalam flask ke dalam tube steril kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 700 G selama 10menit. Supernatan dibuang sedangkan pelet sel disuspensikan dengan 1ml medium komplit. Untuk perhitungan viabilitas sel, suspensi sel diambil sebanyak 10 μ l dan dicampurkan dengan 10 μ l *trypan-blue* (0,4%). Setelah tercampur rata, diambil sebanyak 10 μ l campuran suspensi sel untuk dimasukkan ke dalam *counting slide chamber* dan dihitung menggunakan *Luna automated cell counter*.

3.5.3 Optimasi Konsentrasi DMSO terhadap sel Hep G2

Optimasi konsentrasi DMSO dilakukan terhadap sel Hep G2 untuk mengetahui konsentrasi yang dapat melarutkan ekstrak etanol gambir tanpa mematikan sel atau menurunkan viabilitas sel. Metode yang digunakan adalah 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2-H-tetrazolium bromida (MTT) assay. Medium kultur komplit digunakan sebagai blanko. Sel tanpa DMSO adalah kontrol normal, dan sel dengan medium kultur yang mengandung DMSO 2% digunakan sebagai kontrol positif karena pada konsentrasi tersebut sel telah mengalami kerusakan morfologi hingga kematian sel. Sebanyak 5×10^3 sel ditanam di pelat sumur 96 dan diinkubasi pada suhu 37°C, dan CO_2 5% selama 24 jam. Selanjutnya, medium kultur diganti menggunakan medium kultur yang telah mengandung DMSO dengan berbagai variasi konsentrasi, yaitu: 0; 1,25%; 0,25%; 0,5%; dan 2%. sel diinkubasi kembali pada suhu 37°C, dan CO_2 5% selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Sel yang

sudah diinkubasi sesuai dengan waktu perlakuan di 24 jam, 48 jam, dan 72 jam selanjutnya ditambahkan 50 μL MTT working solution dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C , dan CO_2 5% selama 4 jam. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan 150 μL DMSO untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Agar larutan DMSO tersebar merata pada permukaan sumur maka pelat sumur diletakkan pada shaker datar dengan kecepatan 250 rpm selama 5 menit dan diukur serapan absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm serta dianalisis persentase (%) viabilitas sel.

3.5.4 Persiapan sampel uji EG untuk perlakuan

Larutan stok EG 4000 $\mu\text{g/mL}$: disiapkan dengan menimbang gambir 0,008 gram / 8 mg, lalu dilarutkan dengan DMSO 0.25 % hingga larut sempurna menggunakan vorteks. Konsentrasi DMSO didapatkan dari hasil optimasi sebelumnya. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan filter 0,22 μm *milipore* steril secara aseptik. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat dengan serangkaian konsentrasi larutan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$; 1000 $\mu\text{g/mL}$; 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$; dan 62,5 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar 3.1 Larutan stok EG 4000 $\mu\text{g/mL}$ yang telah dilarutkan dengan DMSO 0,25 % (dokumentasi pribadi)

3.5.5 Uji Konsentrasi Hambatan Setengah Maksimal (*in half-maximal inhibitory concentration-50, IC₅₀*) Ekstrak Etanol Gambir terhadap Sel HepG2

Uji IC_{50} EG terhadap sel Hep G2 dilakukan untuk mengetahui persentase viabilitas sel. Metode yang digunakan adalah 3-4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-2-*H*-tetrazolium bromida (MTT) assay. Sel Hep G2 dibagi ke dalam satu kelompok kontrol yaitu sel Hep G2 tanpa EG serta enam kelompok perlakuan dengan konsentrasi EG berbeda yaitu 2000 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$,

125 µg/mL, 62.5 µg/mL. Untuk uji IC₅₀, sel dikultur (5×10^3 sel/sumur) dalam *well plate*-96 steril dan diinkubasi pada suhu 37°C, dan CO₂ 5% selama 24 jam. Selanjutnya, diganti medium kultur dengan medium kultur yang telah mengandung EG pada berbagai konsentrasi, yaitu: 2000 µg/mL, 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL. Sel diinkubasi kembali 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Sel yang sudah diinkubasi sesuai dengan waktu inkubasinya akan ditambahkan 50 µL MTT working solution pada tiap sumurnya dan diinkubasi selama 4 jam. Setelah itu, supernatan dibuang dan ditambahkan 150 µL DMSO untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk. Agar larutan DMSO tersebar merata pada permukaan sumur maka pelat sumur diletakkan pada shaker datar dengan kecepatan 250 rpm selama 5 menit dan diukur serapan absorbansinya pada panjang gelombang 570 nm serta dianalisis persentase (%) viabilitas sel.

$$\text{Viabilitas sel (\%)} = \frac{\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko}}{\text{Absorbansi kontrol negatif} - \text{Absorbansi blanko}} \times 100$$

Efek pemberian EG terhadap persentase kematian sel Hep G2 (%) dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kematian sel (\%)} = \text{Viabilitas sel kontrol negatif} - \text{viabilitas sel sampel}$$

Kemudian diplot konsentrasi EG (sumbu X) terhadap persentase kematian sel (sumbu Y) dan diperoleh persamaan linier $y = ax + b$. Selanjutnya dihitung nilai IC₅₀ dengan memasukkan nilai $y = 50$ pada persamaan linier yang diperoleh. Dosis EG yang digunakan untuk analisis selanjutnya adalah dosis $\frac{1}{2}$ kali IC₅₀, IC₅₀ dan 2 kali IC₅₀.

Hasil persentase viabilitas sel dari masing-masing kelompok dengan konsentrasi EG yang digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kurva dosis-respons dan dilakukan penghitungan nilai IC₅₀. Sumbu x menunjukkan nilai konsentrasi (µg/mL) EG yang digunakan, sementara itu sumbu y menunjukkan persentase viabilitas sel (%). Adapun nilai IC₅₀ ditentukan dari persamaan garis yang diperoleh, yaitu $y = -0,0379x + 91,629$; dengan $R^2=0,6988$. Berdasarkan

persamaan garis tersebut, maka diperoleh nilai IC_{50} dengan memasukkan konsentrasi 50% atau $y = 50$ ke persamaan linier sebagai berikut :

$$y = -0,0379x + 91,629$$

$$50 = -0,0379x + 91,629$$

$$x = 1.098,39 \mu\text{g/ml}$$

3.5.6 Kultur Sel untuk Isolasi Protein

Untuk isolasi protein, sel dikultur (5×10^5 sel/sumur) dalam mikroplat 6-sumur steril dalam 1000 μL medium pertumbuhan komplet. Kultur sel dibuat dengan dua pengulangan dan diinkubasi pada kondisi 37°C dan 5% CO_2 . Kultur dibagi menjadi kontrol dan perlakuan. Sebagai kontrol, sel hanya dikultur dalam medium tanpa perlakuan EG. Untuk perlakuan sel dikultur dengan 3 dosis yaitu $\frac{1}{2}$ kali IC_{50} , IC_{50} dan 2 kali IC_{50}

3.5.7 Isolasi dan pengukuran protein total

Proses isolasi protein diawali dengan melakukan *harvest* dari sel Hep G2 kelompok kontrol dan kelompok perlakuan dengan inkubasi 48 jam sesuai dengan hasil perlakuan sebelumnya. Isolasi protein dilakukan dengan menggunakan *RIPA Lysis Buffer Solution*. Sel yang telah dipanen dan disentrifuse dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit, dicuci dengan menggunakan DPBS dingin sebanyak 1 kali lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya pelet sel yang telah dipanen diresuspensi dengan 300 μL *RIPA lysis buffer* 1 x yang dilarutkan dengan menggunakan DPBS dingin kemudian digoyangkan secara perlahan selama 10 menit dan disentrifus pada kecepatan 14.000 g selama 15 menit pada suhu 4°C . Setelah selesai, supernatan dipindahkan ke dalam *microtube* yang baru, dan dilakukan pengukuran konsentrasi protein total pada panjang gelombang 280 nm.

Konsentrasi total protein dihitung menggunakan metode Bradford. Prinsipnya, terdapat pengikatan molekul protein ke pewarna Coomassie dalam kondisi asam yang menghasilkan perubahan warna dari coklat menjadi biru. Pertama dilakukan pembuatan larutan stok BSA 1 mg/mL dengan melarutkan 0,01 gram BSA dalam 10 mL akuades. Selanjutnya dibuat larutan BSA dengan variasi konsentrasi 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, dan 16 $\mu\text{g/mL}$. Konsentrasi protein dihitung dengan

memasukkan nilai absorbansi, dimasukkan ke dalam persamaan yang diperoleh dari kurva standar.

3.5.8 Pemeriksaan kadar sitoglobin dengan metode ELISA

Prosedur pemeriksaan kadar CYGB mengacu pada *Human Cytoglobin (CYGB) ELISA Kit (Elabscience, E-EL-H2471)*. Hasil isolasi protein dilakukan sentrifugasi terlebih dahulu dengan kecepatan 1000 g pada suhu 2-8°C selama 20 menit, dan supernatan yang dihasilkan dapat segera digunakan. Larutan standar 5000 pg/mL dibuat dengan menggunakan *standard & sample diluent* dan dilakukan pengenceran untuk membuat larutan standar 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,13; dan 0 pg/mL. Kemudian dimasukkan 100 µL masing-masing larutan standar dan sampel pada tiap sumur, tutup dengan *sealer* yang telah disediakan di kit, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Larutan dibuang, ditambahkan 100 µL *Biotinylated Detection Ab working solution 1x* pada tiap sumur, ditutup dengan *sealer* baru, dan diinkubasi kembali selama 60 menit pada suhu 37°C.

Larutan dibuang dan pencucian dilakukan dengan menggunakan 350 µL *wash buffer 1X* dengan pengulangan sebanyak tiga kali. Selanjutnya ditambahkan 100 µL *HRP conjugate working solution 1x*, ditutup dengan *sealer* baru, dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan dibuang dan pencucian dilakukan dengan menggunakan 350 µL *wash buffer 1x* dengan pengulangan sebanyak lima kali. Pada tiap sumur ditambahkan 90 µL *substrate reagent*, ditutup dengan *sealer* yang baru, dan diinkubasi kembali selama 15 menit, dalam keadaan gelap, pada suhu 37°C. Setelah selesai ditambahkan 50 µL *stop solution* dan diukur serapannya pada panjang gelombang 450 nm. Kurva standar diperoleh dengan plot konsentrasi pada sumbu X terhadap absorbansi rata-rata untuk setiap standar pada sumbu Y menggunakan logistik 4 parameter atau 4-parameter logistic (4-PL).

3.5.9 Pemeriksaan kadar Nrf2 dengan metode ELISA

Prosedur pemeriksaan kadar Nrf2 mengacu pada *Human Nrf2 ELISA Kit* (Thermo Fisher Scientific, EH348RB). Larutan standar 10.000 pg/mL dilarutkan terlebih dahulu menggunakan *standard diluent* dan dilakukan pengenceran untuk membuat larutan standar konsentrasi 3,333; 1,111; 370,4; 123,5; 41,15; 13,72; dan 0 pg/mL. Selanjutnya, dimasukkan masing-masing larutan standar dan sampel sebanyak 100 µL ke dalam sumur, ditutup menggunakan sealer yang disediakan kit, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2.5 jam. Larutan dibuang dan tiap sumur dicuci menggunakan 300 µL *wash buffer* Ix dengan pengulangan sebanyak empat kali. Larutan ditambahkan 100 µL *Biotinylated Detection Ab working solution* 1x pada tiap sumur, ditutup dengan *sealer*, dan diinkubasi kembali selama 60 menit pada suhu ruang. Larutan dibuang dan pada tiap sumur dicuci menggunakan 300 µL *wash buffer* Ix dengan pengulangan sebanyak empat kali. Selanjutnya ditambahkan 100 µL *HRP conjugate working solution* 1X, ditutup dengan *sealer*, dan diinkubasi selama 45 menit pada suhu ruang, dengan *gentle shaking*. Larutan dibuang dan pada tiap sumur dicuci menggunakan 300 µL *wash buffer* Ix dengan pengulangan sebanyak empat kali. Pada tiap sumur ditambahkan 100 µL *TMB substrate* dan diinkubasi kembali selama 30 menit dalam kondisi gelap, pada suhu ruang. Langkah akhir yaitu menambahkan 50 µL *stop solution* untuk menghentikan reaksi dan diukur serapannya pada panjang gelombang 450 nm. Kurva standar diperoleh dengan plot konsentrasi pada sumbu X terhadap absorbansi rata-rata untuk setiap standar pada sumbu Y menggunakan logistik 4 parameter atau 4-parameter logistic (4-PL).

3.5.10 Pemeriksaan Kadar PDGFA Menggunakan Metode ELISA

Prosedur pemeriksaan kadar PDGFA (*Platelet-derived growth factor subunit A*) mengacu pada *Human PDGFA ELISA Kit (FineTest, Catalog No: EH0511)*. Hasil isolasi protein dilakukan sentrifugasi terlebih dahulu dengan kecepatan 1000 g pada suhu 2-8°C selama 20 menit. Supernatan yang dihasilkan dapat segera dipergunakan. Selanjutnya larutan standar 1000 pg/mL dilarutkan menggunakan *standard diluent* dan dilakukan pengenceran untuk membuat larutan standar konsentrasi 500; 250; 125; 62.5; 31.25; 15.625; dan 0 pg/mL. Selanjutnya,

dimasukkan masing-masing larutan standar dan sampel sebanyak 100 μL ke dalam sumur, ditutup menggunakan sealer yang disediakan kit, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 90 menit. Larutan kemudian dibuang, pada tiap sumur dicuci dengan menggunakan 350 μL wash buffer IX dengan pengulangan dua kali. Larutan ditambahkan 100 μL *Biotinylated Detection Ab working solution* 1x pada tiap sumur, ditutup dengan sealer, dan diinkubasi kembali selama 60 menit pada suhu 37°C. Larutan dibuang dan pada tiap sumur dicuci menggunakan 350 μL *wash buffer* Ix dengan pengulangan tiga kali. Selanjutnya ditambahkan 100 μL *HRP-Streptavidin Conjugate (SABC) Working Solution* 1x, ditutup dengan *sealer*, dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Larutan kemudian dibuang, pada tiap sumur dicuci dengan menggunakan 350 μL *wash buffer* Ix dengan pengulangan lima kali. Pada tiap sumur ditambahkan 90 μL *TMB substrate*, ditutup dengan sealer dan diinkubasi kembali dalam kondisi gelap selama 30 menit, pada suhu 37°C. Langkah terakhir adalah menambahkan 50 μL *stop solution* dan diukur serapannya pada panjang gelombang 450 nm. Kurva standar diperoleh dengan plot konsentrasi pada sumbu X terhadap absorbansi rata-rata untuk setiap standar pada sumbu Y menggunakan logistik 4 parameter atau 4-parameter logistic (4-PL).

3.5.11 Analisis Proliferasi Sel

Analisis proliferasi sel Hep G2 dilakukan pengamatan setelah 48 jam sel Hep G2 distimulasi. Pengukuran proliferasi sel dilakukan menggunakan BrdU *cell proliferation* ELISA Kit (*colorimetric*) [Abcam, ab126556]. Sebanyak 5×10^3 sel/well dikultur di 96-multi well plate menggunakan 100 μL medium komplit selama 24 jam dan diinkubasi dalam inkubator 37°C, 5% CO_2 . Setelah inkubasi selama 24 jam, dilakukan penggantian 100 μL medium komplit baru untuk kelompok kontrol, dan 100 μL medium komplit dengan konsentrasi EG $\frac{1}{2}$ kali IC_{50} (500 $\mu\text{g/ml}$), IC_{50} (1000 $\mu\text{g/ml}$) dan 2 kali IC_{50} (2000 $\mu\text{g/ml}$) untuk masing-masing kelompok perlakuan. Sel tersebut diinkubasi kembali inkubator 37 °C, 5% CO_2 selama 48 jam. Selanjutnya sebanyak 20 μL reagen BrdU 1x ditambahkan ke dalam masing-masing well kurang lebih 2 jam sebelum waktu inkubasi perlakuan berakhir, kemudian diinkubasi selama 24 jam.

Setelah itu, cairan di dalam *well* dibuang kemudian dilakukan fiksasi sel

menggunakan 200 μ L *fixing solution* dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, cairan dalam well dibuang dan dilakukan pencucian dengan *wash buffer* 1x sebanyak 3 kali. Proses kemudian dilanjutkan dengan penambahan 100 μ L anti-BrdU *monoclonal detector antibody* ke dalam masing-masing well, dan diinkubasi selama 1 jam di suhu ruang. Setelah proses inkubasi selesai, dilakukan pencucian kembali dengan *wash buffer* 1x sebanyak 3 kali. Setelah proses pencucian, dilakukan penambahan 100 μ L antibodi sekunder *anti-mouse* HRP 1x ke dalam masing-masing *well* dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya, *well* dicuci kembali sebanyak 3x dan dilakukan penambahan 100 μ L substrat TMB ke dalam masing-masing well, serta diinkubasi selama 30 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 100 μ L *stop solution*, kemudian nilai absorbansi dibaca pada panjang gelombang 450 nm.

Prinsip metode ini adalah BrdU (*5-bromo-2'-deoksiuridin*) yang merupakan analog dari nukleosida timidin dapat menyisip di antara sekuens DNA yang baru disintesis selama sel berproliferasi. Konsentrasi BrdU yang terdapat pada sekuens DNA yang baru disintesis tersebut dideteksi dengan teknik ELISA, yaitu dengan direaksikan terhadap anti-BrdU yang terkonjugasi peroksidase. Substrat kromogen TMB (3,3',5,5'-*tetrametilbenzidin*) yang ditambahkan ke dalam campuran tersebut akan menghasilkan produk berwarna kuning. Reaksi tersebut kemudian dihentikan dengan *stop solution* berupa asam kuat yang mengubah produk reaksi tadi menjadi berwarna biru. Warna biru ini bisa dideteksi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm, yang intensitasnya menjadi dasar pembandingan proliferasi sel. Semakin tinggi absorbansi, maka semakin banyak DNA yang baru disintesis dan semakin banyak sel yang berproliferasi.²³

3.5.12 Analisis kadar protein CYGB dengan imunofluoresens

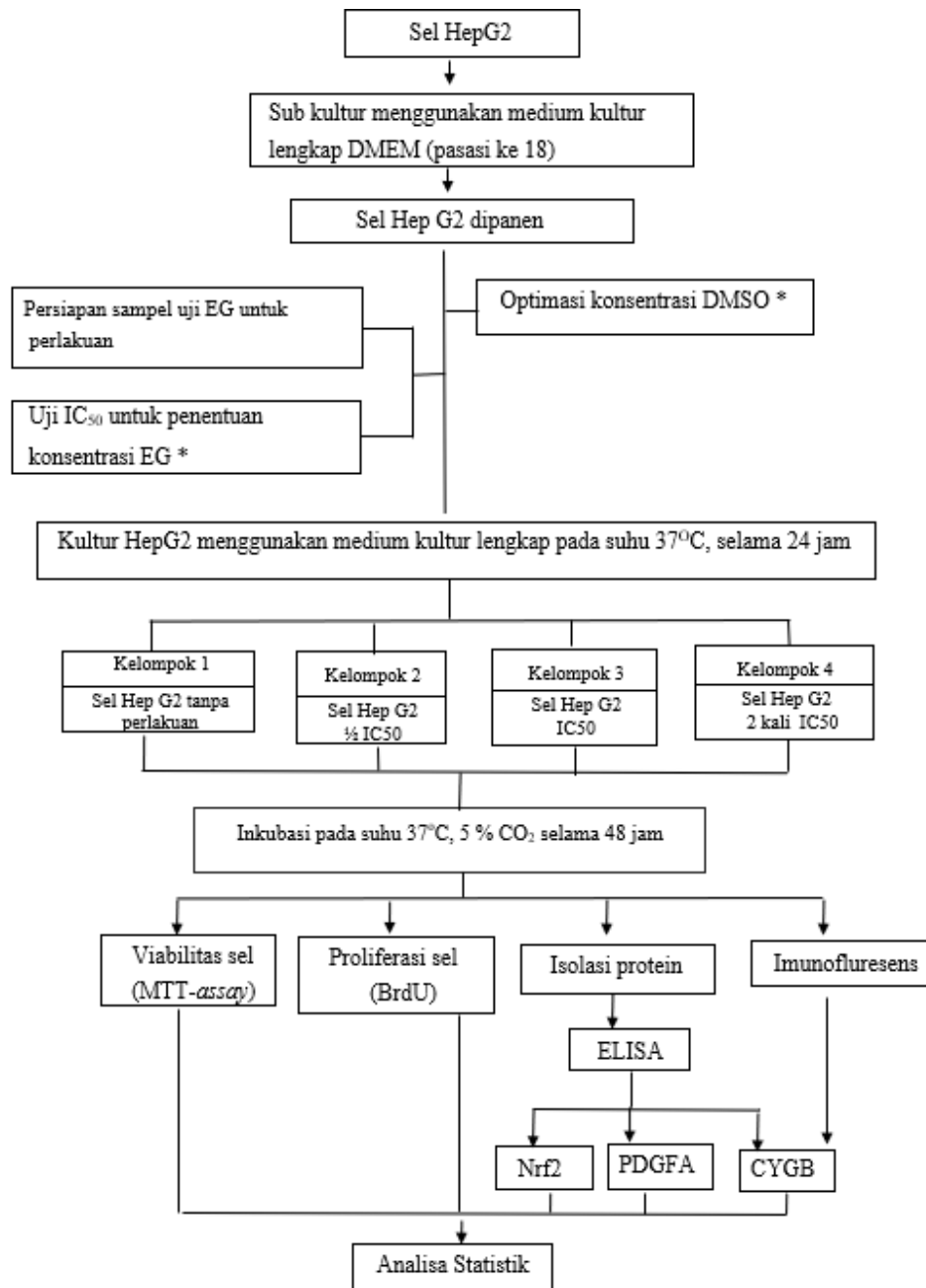
Analisis kadar protein CYGB dengan imunofluoresens dilakukan untuk melihat protein CYGB baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Sel yang telah ditanam dan diberi perlakuan pada *8-well chamber slide* dilakukan fiksasi dengan menambahkan metanol absolut sebanyak 200 μ L selama 30 menit. Selanjutnya sel dicuci menggunakan PBST 0,3% sebanyak tiga kali masing-masing selama 5 menit. Proses *blocking* dilakukan dengan menggunakan BSA 10 % dalam PBS selama 60 menit. Setelah inkubasi berakhir, masing-masing sumur ditambahkan Antibodi

sitoglobulin [Santa cruz] dengan konsentrasi sesuai hasil optimasi dan diinkubasi selama semalam. Sebelum penambahan antibodi sekunder *Goat anti-Mouse IgG Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 633* , dilakukan pencucian sebanyak tiga kali dengan PBST masing-masing selama 5 menit. Inkubasi dengan antibodi sekunder dilakukan selama 60 menit dalam kondisi gelap. Langkah selanjutnya setiap sumur kembali dicuci sebanyak tiga kali dengan PBST masing-masing selama 5 menit lalu ditambahkan DAPI selama 10 menit. Setiap sumur kembali dicuci dengan PBST selama 5 menit sebanyak dua kali. Proses pengamatan sel dilakukan menggunakan *ZOE Flourescent cell imager* [Biorad].

3.5.13 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan perhitungan menggunakan *Microsoft Excel*, selanjutnya dilakukan uji analisis statistic dengan IBM SPSS Statistics 26. Analisis statistik diawali dengan melakukan uji normalitas dan homogenitas agar mengetahui apakah data tersebut memenuhi syarat uji parametrik. Jika distribusi data yang diperoleh normal dan homogen, maka dilakukan uji *One-way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata antar kelompok, serta uji *post-hoc Least Significance Differences (LSD)* untuk mengetahui signifikansi dari perbedaan rata-rata antar kelompok tersebut. Analisis korelasi pada data yang memenuhi syarat parametrik akan dilakukan menggunakan uji Pearson. Sementara itu, jika distribusi data tidak normal dan homogen sehingga tidak memenuhi syarat uji parametrik, maka akan dilakukan analisis statistik menggunakan uji non-parametrik yaitu Kruskal Wallis serta Mann-Whitney sebagai uji *post-hoc*, dan uji Spearman untuk analisis korelasi.

3.6 Alur Penelitian



Keterangan: *) dilakukan analisis pada sel yang dikultur selama kultur 24 jam, 48 jam, dan 72 jam.

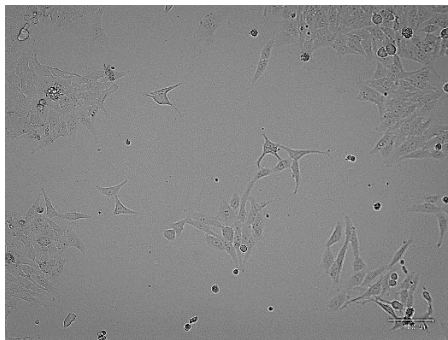
BAB 4

HASIL PENELITIAN

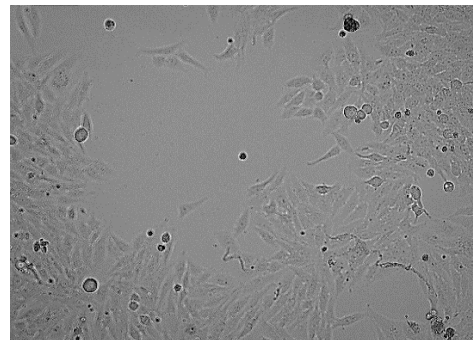
4.1 Kultur sel HepG2

Kultur sel HepG2 dan pengamatan pertumbuhan sel dan ada tidaknya kontaminasi serta pergantian medium komplit dilakukan setiap dua atau tiga hari. Sel HepG2 dipanen dan dilakukan subkultur ketika sel mencapai konfluensi 70-80%.

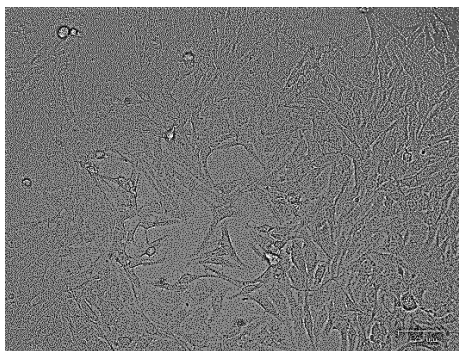
A. Hari ke 1



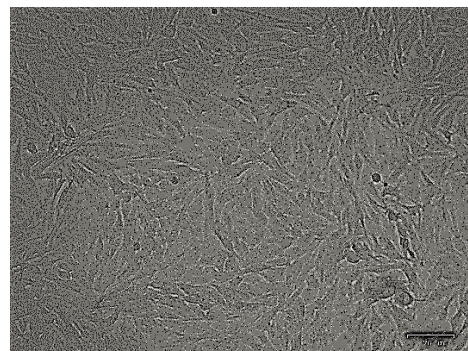
B. Hari ke 2



C. Hari ke 3



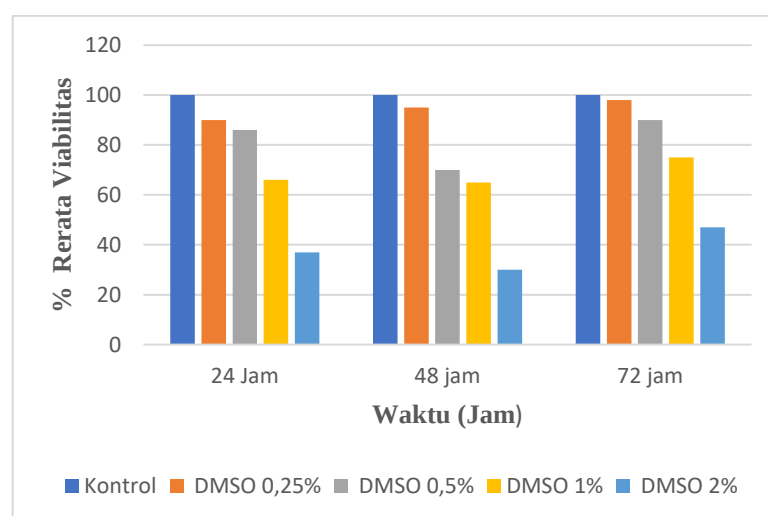
D. Hari ke 4



Gambar 4.1 Hasil kultur sel HepG2 selama 4 hari berturut-turut. (A). Hari ke 1 konfluensi 10 %. (B) Hari ke 2 konfluensi 30 % (C) Hari ke 3 konfluensi 80 %. (D) Hari ke 4 konfluensi 90 %. Sel HepG2 diamati melalui Brightfield ZOE *Fluorescent Cell Imager* (Bio-rad) dengan objective 20 kali.

4.2 Optimasi konsentrasi DMSO (sebagai pelarut EG) melalui uji viabilitas Sel Hep G2 pada pemaparan 24, 48, dan 72 Jam.

Sel Hep G2 ditanam sebanyak 5×10^3 sel dalam mikrotiter 96-sumur dengan berbagai variasi konsentrasi DMSO 0,25; 0,5; 1; dan 2 %. Sel Hep G2 di analisis viabilitasnya dengan metode MTT dengan waktu pemaparan larutan DMSO selama 24, 48, dan 72 jam. Hasil menunjukkan bahwa terjadi penurunan viabilitas sel Hep G2 saat di kultur dalam medium yang mengandung DMSO sebanding dengan peningkatan kadar DMSO (0,25 %; 0,5 %; 1%; dan 2 %) baik pada pemaparan 24 jam, 48 jam, serta 72 jam (Gambar 4.2) dan Tabel 4.1.



Gambar 4.2 Pengaruh pemberian DMSO terhadap rerata viabilitas sel Hep G2 yang dikultur selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Terdapat penurunan pada viabilitas sel Hep G2 yang dikultur dalam medium dengan berbagai konsentrasi DMSO dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 4.1 Rerata viabilitas fibroblas setelah 24, 48, dan 72 jam pemaparan berbagai konsentrasi DMSO

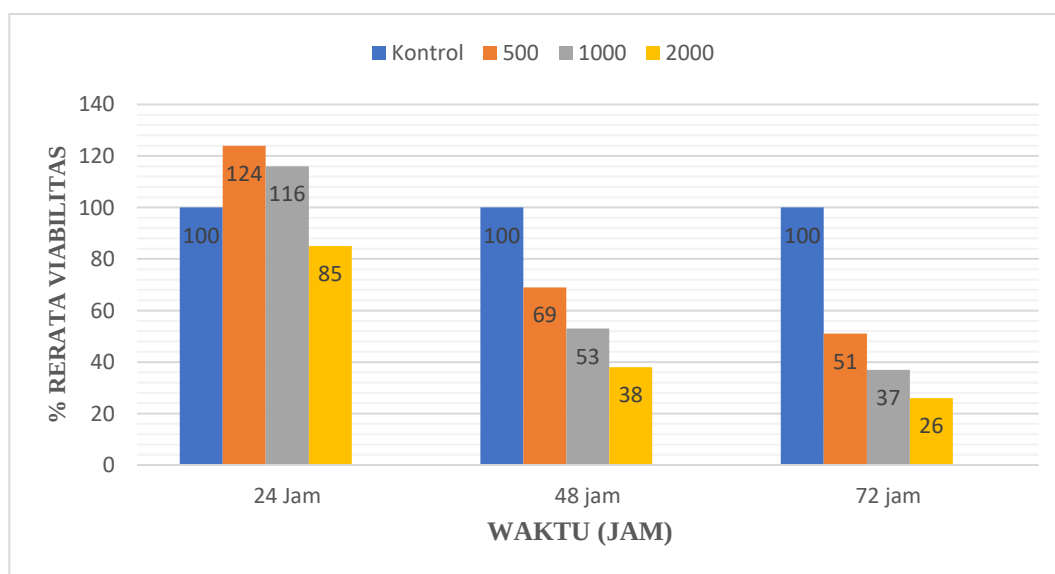
Konsentrasi DMSO (%)	Rerata viabilitas (%)		
	24 Jam	48 Jam	72 Jam
0,25	90	95	98
0,5	86	70	90
1	66	65	75
2	37	30	47

Rerata viabilitas sel HepG2 pada pemaparan 24, 48 dan 72 jam menunjukkan viabilitas paling tinggi pada konsentrasi DMSO 0,25%, yaitu 90%; 95% dan 98% berturut-turut. Selanjutnya kadar DMSO 0,25% digunakan sebagai kadar DMSO untuk melarutkan EG pada analisis selanjutnya.

4.3 Uji toksisitas EG terhadap sel Hep G2

Untuk mengetahui efek toksik EG terhadap sel HepG2, dilakukan uji IC_{50} . Sel Hep G2 ditanam sebanyak 5×10^3 sel di dalam mikropelat 96-sumur dengan berbagai konsentrasi EG yang dilarutkan dalam DMSO 0,25%. Konsentrasi EG yang digunakan adalah 0; 125; 250; 500; 1000; dan 2000 $\mu\text{g/mL}$. Viabilitas sel Hep G2 diukur menggunakan uji MTT.

IC_{50} dari EG adalah 1.098,39 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian ini akan menggunakan konsentrasi EG yaitu $\frac{1}{2}$ kali IC_{50} (500 $\mu\text{g/mL}$); IC_{50} (1000 $\mu\text{g/mL}$); dan 2 kali IC_{50} (2000 $\mu\text{g/mL}$) dengan waktu pengamatan selama 48 jam.



Gambar 4.3 Pengaruh pemberian EG terhadap rerata viabilitas sel Hep G2 yang dikultur selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Terdapat penurunan pada viabilitas sel Hep G2 yang dikultur dalam medium dengan berbagai konsentrasi EG dibandingkan dengan kontrol.

4.4. Kadar protein total dalam kultur sel Hep G2 yang diberi berbagai kadar EG dan pada kelompok kontrol

Sel Hep G2 ditanam sebanyak 5×10^5 sel di dalam mikropelat 6-sumur steril. Kultur dibagi menjadi kontrol dan 3 perlakuan. Sebagai kontrol, sel dikultur dalam medium tanpa perlakuan EG. Untuk perlakuan sel dikultur dalam 3 dosis EG yaitu $\frac{1}{2}$ kali IC_{50} , IC_{50} dan 2 kali IC_{50} .

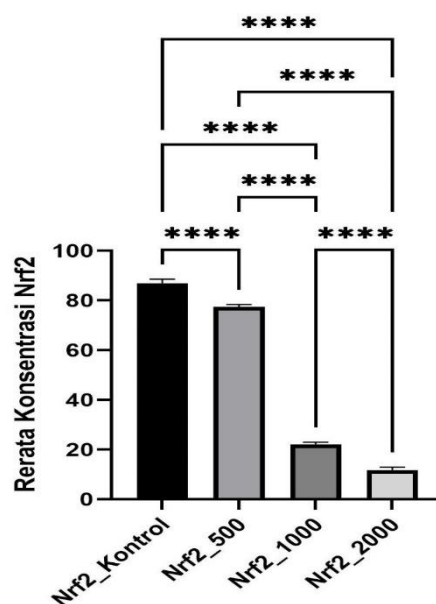
Proses isolasi protein diawali dengan memanen sel Hep G2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dengan waktu inkubasi 48 jam. Isolasi protein dilakukan dengan menggunakan *RIPA lysis buffer solution*. Konsentrasi protein total dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi ke dalam persamaan yang diperoleh dari kurva standar BSA dengan menggunakan serangkaian larutan standar BSA (0.5 µg/mL; 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 8 µg/mL, dan 16 µg/mL). Kurva standar BSA dapat dilihat pada lampiran 3. Kadar protein total dapat dilihat pada tabel 4.2

Tabel 4.2 Kadar protein total sel Hep G2 kelompok kontrol dan perlakuan

No		Rerata A595	Kadar protein total (µg/mL)
1	Sel Hep G2 tanpa EG	0,5015	465
2	Sel Hep G2 dengan EG 500 µg/mL	0,4895	437,5
3	Sel Hep G2 dengan EG 1000 µg/mL	0,3805	187,5
4	Sel Hep G2 dengan EG 2000 µg/mL	0,338	171,5

4.5 Kadar protein Nrf2 sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol.

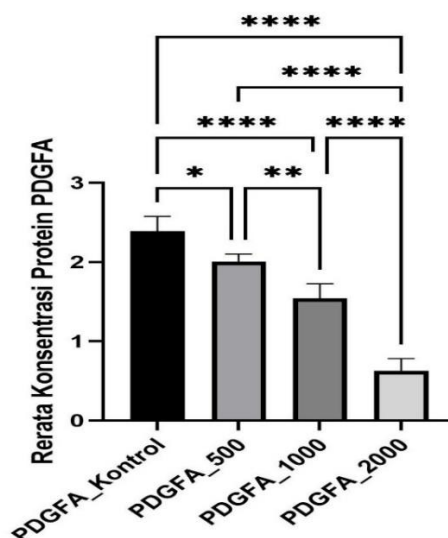
Kadar protein Nrf2 dihitung berdasarkan kurva standar Nrf2 (Lampiran 5). Konsentrasi Nrf2 dinyatakan dalam satuan pg/mg protein total. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar Nrf2 pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Anova, *LSD-test*, $p = 0,000$ atau $p < 0,0001$). Kadar Nrf2 pada penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok HepG2 dengan penambahan 500 $\mu\text{g/mL}$. Kadar Nrf2 pada penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok HepG2 dengan penambahan 500 $\mu\text{g/mL}$. Demikian pula kadar Nrf2 pada penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok 1000 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan kadar protein Nrf2 pg/mg protein total dapat dilihat pada gambar 4.4.



Gambar 4.4 Kadar Nrf2 sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol (**** = $p < 0,0001$; Anova; uji LSD)

4.6 Kadar PDGFA sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol

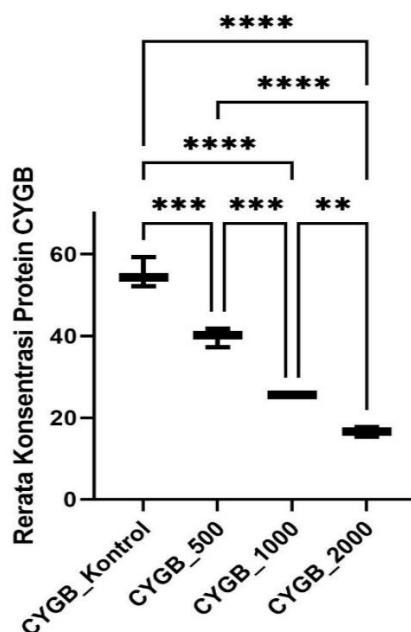
Kadar protein PDGFA dihitung berdasarkan kurva standar PDGFA (Lampiran 6). Konsentrasi PDGFA dinyatakan dalam satuan pg/mg protein total. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna kadar PDGFA pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol (Anova, LSD test, $p = 0,000$ atau $p < 0,0001$). Kadar PDGFA pada penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 500 $\mu\text{g/mL}$. Kadar PDGFA pada penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 500 $\mu\text{g/mL}$. Demikian pula kadar PDGFA pada penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan kadar protein PDGFA pg/mg protein total dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.5 Kadar protein PDFGA sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol (**** = $p < 0,0001$; Anova; uji LSD)

4.7 Kadar protein CYGB dalam sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol

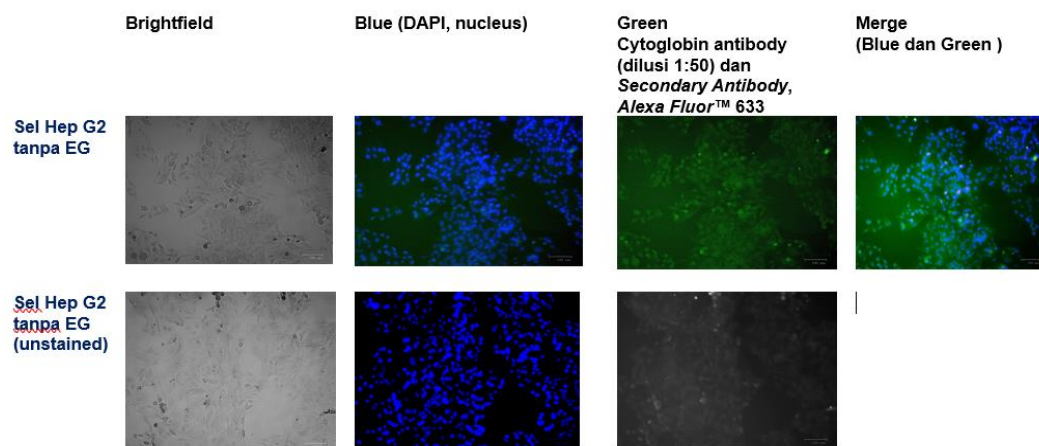
Kadar protein CYGB dihitung berdasarkan kurva standar CYGB (Lampiran 4). Konsentrasi CYGB dinyatakan dalam satuan pg/mg protein total. Hasil menunjukkan bahwa terdapat perbedaan kadar CYGB yang bermakna pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kadar CYGB pada penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kadar CYGB pada penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah bermakna dibandingkan dengan kelompok sel Hep G2 dengan penambahan EG 500 $\mu\text{g/mL}$. Demikian pula kadar CYGB pada penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ terdapat perbedaan bermakna dibandingkan dengan kelompok sel Hep G2 dengan penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$. Perbedaan kadar protein CYGB pg/mg protein total dapat dilihat pada gambar 4.6.



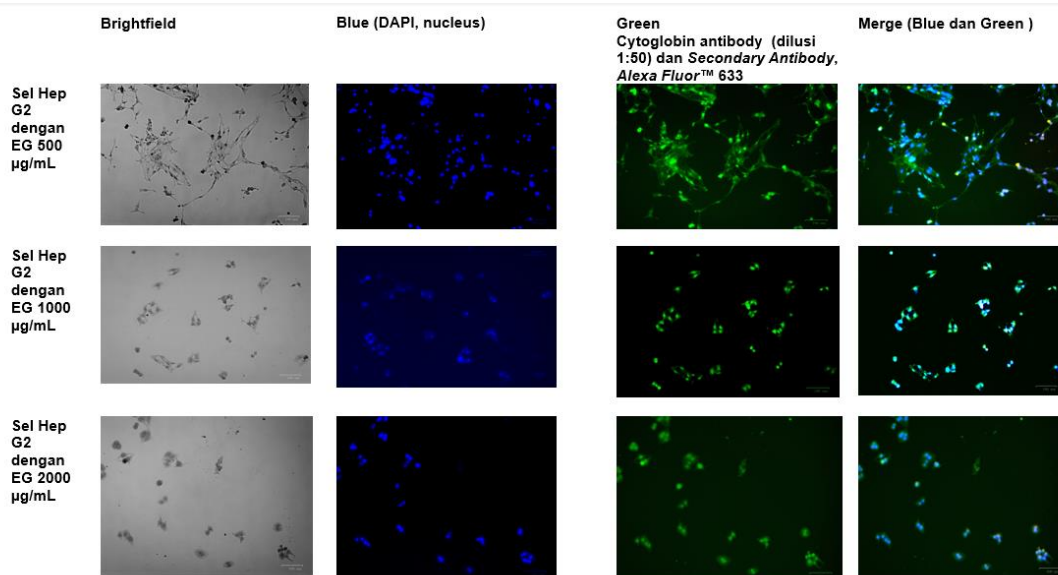
Gambar 4.6 Kadar CYGB pg/mg protein total sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi (**** = $p < 0,0001$, *** = 0.001, ** = 0,005); Mann-Whitney; Kruskal Wallis) dibandingkan kontrol.

4.8 Analisis ekspresi protein CYGB dalam sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol

Ekspresi CYGB pada sel HepG2 juga dilakukan dengan metode Imunofluoresens. Hasil menunjukan bahwa CYGB terekspresi lebih sedikit pada semua kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol yang dapat dilihat pada Gambar 4.7.1 dan 4.7.2



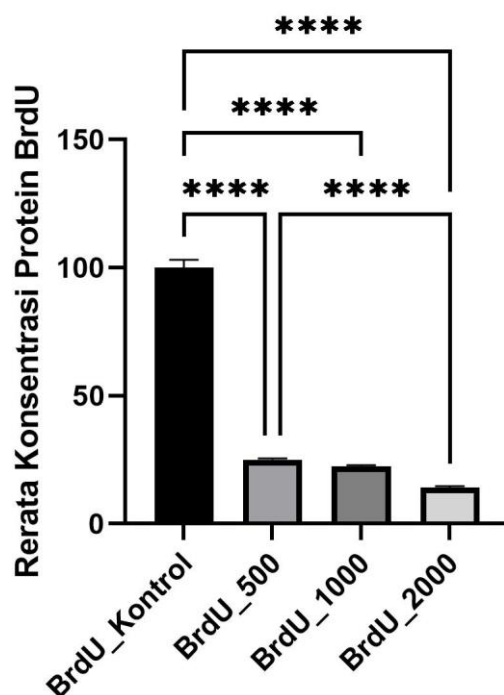
Gambar 4.7 .1. Ekspresi CYGB pada pewarnaan Immunofluoresence pada sel Hep G2 tanpa EG (kelompok kontrol). *Blue fluorescence = 4'6-diamidino-2phenylindole(DAPI) labeled Hep G2 cell nucleus, green fluorescence = Cytochrome b5 antibody labelled, Merge = penggabungan blue dan green field).* **Scale bar = 100 μ m**



Gambar 4.7 2. Ekspresi CYGB pada pewarnaan Immunofluoresence pada sel Hep G2 dengan berbagai konsentrasi EG . *Blue fluorescence = 4'6-diamidino-2phenylindole(DAPI) labeled Hep G2 cell nucleus, green fluorescence = Cytochrome b5 antibody labelled, Merge = penggabungan blue and green field).* Terlihat ekspresi CYGB menurun dibandingkan kelompok kontrol, dan menurun seiring dengan bertambahnya konsentrasi EG. **Scale bar = 100 μ m**

4.9 Proliferasi sel Hep G2 pada penambahan EG berbagai konsentrasi dibandingkan kontrol

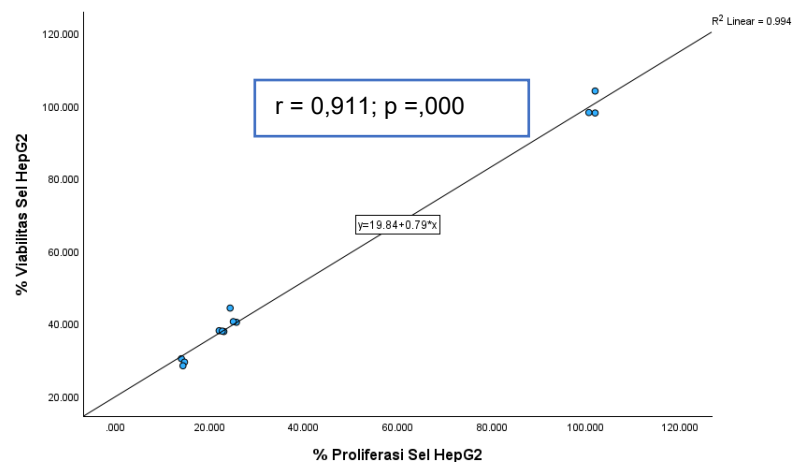
Analisis proliferasi sel Hep G2 yang dikultur dalam medium pertumbuhan komplet dengan atau tanpa EG berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 4.8. Hasil menunjukkan bahwa proliferasi Hep G2 mengalami penurunan saat ditambahkan EG berbagai konsentrasi (500 µg/mL; 1000 µg/mL; 2000 µg/mL), pada waktu 48 jam. Penurunan proliferasi sel Hep G2 bermakna (Kruskal Wallis, $p < 0,001$) terdapat pada seluruh kelompok perlakuan mengandung EG (500 µg/mL; 1000 µg/mL; 2000 µg/mL) dibandingkan dengan kelompok kontrol.



Gambar 4.8 Pengaruh Penambahan EG Berbagai Konsentrasi terhadap proliferasi sel Hep G2(* = $p < 0,0001$, ; Mann-Whitney; Kruskal Wallis)

4.10 Korelasi antara Viabilitas sel HepG2 dengan Proliferasi sel HepG2

Hasil analisis korelasi antara viabilitas sel HepG2 dengan proliferasi sel HepG2 dapat dilihat digambar 4.9. Hasil tersebut menunjukkan adanya terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara viabilitas sel HepG2 dengan proliferasi sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,911$; $p = 0,000$).



Gambar 4.9 Analisis korelasi antara viabilitas sel HepG2 dengan proliferasi sel HepG2. Terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara viabilitas sel HepG2 dengan proliferasi sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,911$; $p = 0,000$)

4.11 Korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan proliferasi sel HepG2 ;

Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2; PDGFA dengan proliferasi sel HepG2

Hasil analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan proliferasi sel HepG2 dapat dilihat pada tabel 4.3. Hasil menunjukkan terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan proliferasi sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,937$; $p = 0,000$), terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,914$; $p = 0,000$), serta korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein PDGFA dengan proliferasi sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,936$; $p = 0,000$).

Tabel 4.3 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan proliferasi sel Hep G2.

No	Uji Korelasi	Proliferasi HepG2	
		r	p
1.	CYGB	0,937	0,000
2.	Nrf2	0,914	0,000
3.	PDGFA	0,936	0,000

4.12 Korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan viabilitas sel HepG2 ;

Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2 ; PDGFA dengan viabilitas sel HepG2

Hasil analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan viabilitas sel HepG2 dapat dilihat pada tabel 4.4. Hasil menunjukkan terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan viabilitas sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,960$; $p = 0,000$), terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,923$; $p = 0,000$), serta korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein PDGFA dengan viabilitas sel HepG2 (Rank-Spearman, $r = 0,958$; $p = 0,000$).

Tabel 4.4 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB, Nrf2, dan PDGFA dengan viabilitas sel Hep G2.

No	Uji Korelasi	Viabilitas HepG2	
		r	p
1.	CYGB	0,960	0,000
2.	Nrf2	0,923	0,000
3.	PDGFA	0,958	0,000

4.13 Korelasi antara Ekspresi Protein CYGB dengan Nrf2 ; Ekspresi Protein PDGFA dengan CYGB ; Protein Nrf2 dengan PDGFA

Hasil analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan Nrf2, ekspresi protein CYGB dengan PDGFA serta ekspresi Protein Nrf2 dengan PDGFA dapat dilihat tabel 4.5. Hasil tersebut menunjukkan adanya terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan Nrf2 (Rank-Spearman, $r = 0,889$; $p = 0,000$), terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan PDGFA (Rank-Spearman, $r = 0,862$; $p = 0,000$), serta terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein Nrf2 dengan PDGFA (Rank-Spearman, $r = 0,943$; $p = 0,000$).

Tabel 4.5 Analisis korelasi antara ekspresi protein CYGB dengan Nrf2, CYGB dengan PDGFA, dan Nrf2 dengan PDGFA

No	Uji Korelasi	CYGB		Nrf2		PDGFA	
		r	p	r	p	r	p
1.	CYGB			0,889	0,000	0,862	0,000
2.	Nrf2					0,943	0,000

BAB 5

PEMBAHASAN

5.1 Penggunaan kultur sel HepG2

Penelitian ini menggunakan sel HepG2 yang merupakan sel lini kanker hepatoma yang paling sering digunakan pada manusia dalam studi mengenai metabolisme obat dan studi hepatotoksitas.^{73, 74} Sel HepG2 adalah sel dengan morfologi mirip dengan epitel dan tingkat proliferasi yang tinggi. Diameter rata-rata dari sel HepG2 adalah sekitar 10-20 μm , dan berbentuk polygonal. Di antara sel lini hati lainnya, sel HepG2 adalah sel lini pertama yang menunjukkan karakteristik utama dari sel hepatosit. Oleh karena itu, sel HepG2 digunakan untuk mempelajari efek toksik dari logam berat, nanopartikel, dan obat-obatan *in vitro*. Penggunaan sel HepG2 untuk mempelajari metabolisme obat antikanker dapat dilakukan karena adanya kesamaan dalam ekspresi metabolisme obat pada fase I, II, dan III atau protein transpor dalam sel dengan HCC.⁷³

5.2 Optimasi konsentrasi DMSO sebagai pelarut EG melalui uji viabilitas

Pada penelitian ini digunakan *Dimethyl sulfoxide* (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) untuk melarutkan EG. DMSO adalah cairan organik yang sangat polar sehingga banyak digunakan sebagai pelarut.⁷⁵ Pada penelitian *in vitro*, DMSO secara rutin digunakan untuk kriopreservasi karena suhu bekunya yang tinggi. DMSO mampu melarutkan sejumlah besar komponen kecil non-polar dan polar, meningkatkan permeabilitas membran sel dikarenakan mempunyai interaksi yang kuat dengan fosfolipid sehingga membuatnya efisien dalam memfasilitasi pengiriman molekul obat melalui membran sel.^{76, 77} Optimasi untuk menentukan konsentrasi DMSO yang akan digunakan sebagai pelarut EG dalam penelitian ini dilakukan melalui uji viabilitas dengan *MTT assay*. Rerata viabilitas sel HepG2 pada paparan 24, 48 dan 72 jam menunjukkan viabilitas paling tinggi pada konsentrasi DMSO 0,25%, yaitu 90%; 95% dan 98% berturut-turut. Selanjutnya kadar DMSO 0,25% digunakan sebagai kadar DMSO untuk melarutkan EG pada analisis selanjutnya. Hasil ini sejalan dengan penelitian oleh Nguyen dkk 2020 bahwa konsentrasi

DMSO yang digunakan pada sel HepG2, MDA-MB-231, dan MCF-7 sebagai pelarut dalam diantara 0.6 – 0.015 %.⁷⁷

5.3 Uji IC50 terhadap sel Hep G2

Optimasi EG untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan dalam penelitian dilakukan melalui penghitungan nilai IC50. *Half-maximal inhibitory concentration* (IC50) digunakan secara luas sebagai pengukuran yang bersifat informatif untuk efikasi suatu obat. IC50 menunjukkan kemampuan suatu senyawa atau obat dalam menghambat proses biologi hingga mencapai 50 %.⁷⁸ Nilai IC50 dari ekstrak gambir yang digunakan adalah 1.098,39 µg/mL. Nilai tersebut kemudian menjadi patokan dalam penentuan dosis EG yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu ½ kali IC₅₀ (500 µg/mL); IC₅₀ (1000 µg/mL); dan 2 kali IC₅₀ (2000 µg/mL) dengan waktu pengamatan selama 48 jam. Waktu pengamatan dilakukan selama 48 jam sesuai dengan waktu ditentukannya nilai IC₅₀ dari ekstrak gambir.

5.4 Pemberian EG Menurunkan Ekspresi Nrf2 pada sel HepG2

Pemberian EG pada sel HepG2 menurunkan secara bermakna ekspresi Nrf2 dibandingkan dengan kontrol yang tidak diberi EG. Ekspresi Nrf2 yang lebih rendah pada kultur sel HepG2 pada penelitian ini diduga akibat aktivitas antikanker dari senyawa polifenol pada EG.^{8, 9} Katekin merupakan salah satu senyawa polifenol yang terdapat pada gambir.⁹ Aktivitas antikanker dari katekin mampu menekan proliferasi sel dengan menginduksi apoptosis, menghambat angiogenesis, dan metastasis dari sel kanker.⁷⁹ Katekin juga mampu menekan proliferasi sel MCF7 dan menginduksi apoptosis dengan memodulasi ekspresi dari *caspase-3*,^{-8,-9.} dan *p53*.¹³ Woo dkk mengemukakan bahwa senyawa polifenol dapat menghambat Nrf2 sehingga tidak terjadi sintesis enzim antioksidan yang berakibat pada peningkatan sensitivitas sel kanker terhadap terapi, mengurangi ukuran tumor dan kematian sel.¹⁴

5.5 Pemberian EG Menurunkan PDGFA pada sel HepG2

Pemberian EG pada sel HepG2 menyebabkan penurunan bermakna ekspresi protein PDGFA pada sel Hep G2 dibandingkan dengan kontrol. Pada HCC, PDGF dikaitkan dengan prognosis buruk dan tingginya tingkat metastasis. Interaksi PDGFA dan reseptornya menyebabkan respon seluler seperti proliferasi dan migrasi melalui jalur persinyalan P13K/AKT dan MEK. Penekanan persinyalan PDGF ternyata dapat mengurangi pertumbuhan dan metastasis dari HCC pada manusia.^{16, 17}

Ekspresi PDGFA yang rendah pada kultur sel HepG2 pada penelitian ini dapat disebabkan oleh aktivitas senyawa di dalam tanaman gambir yaitu *gambirin* A1, *procyanidin* B2, dan *neooxygambirtannine* yang dibuktikan pada uji *in silico*, karena senyawa tersebut dapat berikatan dengan reseptor PDGFA.¹⁵

5.6 Pemberian EG Menurunkan Ekspresi CYGB pada sel HepG2

Ekspresi protein CYGB menurun secara bermakna pada sel HepG2 yang diberikan EG dibandingkan dengan kontrol tanpa pemberian EG, baik pada pemeriksaan dengan teknik ELISA maupun dengan teknik imunofluoresens. Ekspresi CYGB yang lebih rendah pada kultur sel HepG2 setelah pemberian gambir menunjukkan potensi hambatan fungsi onkogenik dari CYGB akibat pemberian EG. Hingga saat ini belum dijumpai studi yang menghubungkan antara pemberian EG dengan ekspresi CYGB pada sel kanker. Hal ini berbeda dengan hasil pada penelitian Amalia *et al* 2022 yang menjelaskan peningkatan CYGB pada sel fibroblas keloid setelah pemberian EG dengan konsentrasi 12,5 µg/mL dan 25 µg/mL.²³

Fungsi onkogenik CYGB dijelaskan melalui kemampuan CYGB dalam menghambat faktor apoptosis seperti caspase 2/3.⁶⁹ Penelitian Tian *et al* pada tikus yang diinduksi hipoksia, menunjukan bahwa CYGB berperan dalam *down*-regulasi *caspase* 2 dan 3 pada otak tikus sehingga terjadi hambatan apoptosis.⁸⁰

Peningkatan ekspresi CYGB ditemukan pada beberapa jenis kanker seperti *alveolar soft part sarcoma*, karsinoma paru, dan kanker kepala leher.^{70, 71}. Di sisi lain, CYGB diduga mempunyai peran bimodal yaitu sebagai penekan tumor dalam

keadaan normoksia, serta fungsi onkogenik yang menyebabkan kemoresistensi, dan perkembangan sel kanker.²⁰

5.7 Pemberian EG menurunkan viabilitas dan proliferasi sel Hep G2

Viabilitas sel HepG2 yang dianalisis dengan uji MTT, menunjukkan penurunan viabilitas yang bermakna pada pemberian EG dibandingkan dengan kontrol. Viabilitas adalah kondisi yang menunjukkan jumlah sel hidup dalam suatu populasi sel.⁸¹ Uji MTT menilai aktivitas metabolik sel sebagai salah satu indikator sel hidup. MTT merupakan garam tetrazolium berwarna kuning yang mampu direduksi oleh sel hidup menjadi kristal formazan berwarna ungu. Reaksi tersebut dikatalisis oleh enzim NAD(P)H-oksireduktase, yang terdapat dalam sitosol. Oleh karena itu reduksi MTT bergantung pada aktivitas metabolik sel karena adanya fluks NAD(P)H pada sel hidup.⁸²

Hasil menunjukkan bahwa terjadi penurunan viabilitas HepG2 secara bermakna pada pemberian EG 500 µg/mL; 1000 µg/mL; dan 2000 µg/mL dibandingkan dengan kontrol dalam waktu 48jam. Tampak bahwa penurunan viabilitas sel HepG2 meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi EG. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Syarifah, dkk 2019⁸, yang juga menggunakan uji MTT, menunjukkan bahwa pemberian *Uncaria gambir* menurunkan viabilitas sel lini kanker payudara T47D, namun masih lebih lemah dari doxorubicin (DOX).⁸ Penelitian lain yang sejalan dilakukan oleh Wardana dkk 2022⁹ menunjukkan bahwa pemberian EG menurunkan viabilitas sel HeLa.

Selain pengukuran viabilitas, penelitian ini juga melakukan pengukuran proliferasi sel Hep G2 yang dikultur dengan atau tanpa EG. Proliferasi adalah proses pembelahan sel sehingga memicu peningkatan jumlah sel.^{83, 84} Pengukuran proliferasi sel pada penelitian ini dilakukan dengan uji BrdU. BrdU merupakan analog timidin yang mampu terinkorporasi pada untai DNA yang baru direplikasi pada fase S siklus sel. BrdU yang telah terinkorporasi dalam DNA kemudian dapat dilacak menggunakan *probe antibody*.⁸⁵

Penurunan viabilitas dan proliferasi sel HepG2 pada penelitian ini diduga disebabkan oleh komponen senyawa polifenol dalam tanaman gambir yang dapat menghambat proliferasi sel, dengan menginduksi apoptosis, menghambat

angiogenesis, dan metastasis dari sel kanker.⁷⁹ Katekin juga mampu menekan proliferasi sel MCF7 dan menginduksi apoptosis dengan memodulasi ekspresi dari caspase-3,-8,-9. dan p53.¹³ Kandungan polifenol yang terdapat pada EG diduga memicu apoptosis sel melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Jalur instrik terutama melalui *caspase* (*protease cysteine-dependent aspartate*), sedangkan jalur ekstrinsik melalui aktivasi ligan spesifik (TNF α , FasL, TRAIL) yang berikatan dengan reseptor permukaan sel (TNF-R, Fas, TRAIL-R). Selanjutnya terjadi rekrutmen protein adaptor seperti FADD dan aktivasi dari *inisiator caspase*.⁸⁶

5.8 Hubungan ekspresi protein CYGB dengan proliferasi sel HepG2 dan Hubungan ekspresi protein CYGB dengan viabilitas sel HepG2

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan proliferasi dan viabilitas sel Hep G2 dapat dilihat pada tabel 4.3 dan tabel 4.4. Hasil uji korelasi ini mendukung peran onkogenik CYGB yang menyebabkan kemoresistensi, dan perkembangan sel kanker.²⁰ Oleksiewicz dkk 2013 menjelaskan pada studi *in vitro* bahwa CYGB berperan potensial sebagai onkogen pada sel pada keadaan stress. Pada keadaan hipoksia terjadi overekspresi dari CYGB yang menyebabkan penurunan viabilitas sel. CYGB akan mengalami adaptasi dalam menghadapi stress dengan melakukan banyak mekanisme pertahanan seperti aktivasi jalur persinyalan, homeostasis metabolisme dan redoks. Respon adaptasi ini berkaitan dengan agresivitas dari tumor, peningkatan kemoresistensi, dan radioresistensi serta prognosis buruk dari pasien kanker. ^{87, 88}Peningkatan ekspresi CYGB ditemukan pada beberapa jenis kanker seperti *alveolar soft part sarcoma*, karsinoma paru⁸⁸, dan kanker kepala leher.^{70, 71} Dari berbagai laporan tersebut, jika diteliti lebih mendalam, dapat dikatakan bahwa CYGB memiliki peran ganda baik sebagai tumor supresor maupun onkogen tergantung dari jenis sel, stadium tumor, kondisi lingkungan mikro, serta ketersediaan dari oksigen.^{22, 89}

5.9 Hubungan ekspresi protein Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2 dan Hubungan ekspresi protein Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein Nrf2 dengan proliferasi dan viabilitas sel Hep G2 dapat dilihat pada tabel 4.3 dan tabel 4.4. Hal ini berarti peningkatan ekspresi protein Nrf2 akan meningkatkan proliferasi Nrf2, serta peningkatan ekspresi protein Nrf2 akan meningkatkan viabilitas Nrf2. Hasil ini sejalan Zhang *et al* 2015 yang menjelaskan bahwa Nrf2 berkaitan dengan kelangsungan hidup sel, diferensiasi, ukuran tumor, dan proliferasi sel HCC sehingga Nrf2 dapat digunakan sebagai faktor prognostik independen.⁷ Raghunath *et al* 2018 juga menjelaskan bahwa pada HCC terjadi aktivasi Nrf2 secara persisten yang menyebabkan proliferasi dan resistensi obat³⁴.

5.10 Hubungan ekspresi protein PDGFA dengan proliferasi sel HepG2 dan Hubungan ekspresi protein PDGFA dengan viabilitas sel HepG2

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein PDGFA dengan proliferasi dan viabilitas sel Hep G2 dapat dilihat pada tabel 4.3 dan tabel 4.4. Hal ini berarti peningkatan ekspresi protein PDGFA akan meningkatkan proliferasi sel HepG2, serta peningkatan ekspresi protein PDGFA akan meningkatkan viabilitas sel HepG2. Penelitian Han *et al* 2021 menjelaskan peningkatan PDGFA adalah prognosis buruk sehingga mampu dijadikan biomarker potensial dan target molekular terapi pada pasien karsinoma esofagus.⁹⁰ Hubungan antara PDGF dengan proliferasi sel kanker dan viabilitas sel kanker disebabkan oleh mekanisme kerja yang bersifat autokrin dan adanya *crosstalk* dari persinyalan PDGF/PDGFR dengan jalur *matrix metalloprotein* (MMP) yang meningkatkan ekspresi MMP9, dan VEGF sehingga meningkatkan proliferasi, migrasi, dan metastasis sel kanker, serta aktivasi berbagai jalur persinyalan yang berperan dalam perkembangan sel kanker.⁵⁴

5.11 Hubungan ekspresi protein Nrf2 dan PDGFA

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein Nrf2 dengan PDGFA (Rank-Spearman, $r = 0,943$; $p = 0,000$) yang ditunjukkan pada tabel 4.5. Hal ini berarti peningkatan ekspresi protein NRF2 akan meningkatkan ekspresi PDGFA. Hubungan Nrf2 dan PDGF pada proses molekular HCC dikarenakan Nrf2 melakukan rekrutmen Sp1 dengan promotor PDGF sehingga meningkatkan ekspresi dari PDGFA.³ Mekanisme yang mengatur Nrf2 dan PDGF sama sama terganggu dalam proses perkembangan tumor pada HCC. Pada HCC, Nrf2 akan mengalami upregulasi, mempromosikan proliferasi sel HCC, dan upregulasi PDGF. Temuan ini menunjukkan adanya hubungan korelasi positif sangat kuat antara Nrf2 dan PDGFA pada sel kanker Hep G2³, dimana ditemukan penurunan secara bermakna baik Nrf2 dan PDGFA pada kelompok yang mendapat pemberian gambir dibandingkan kelompok kontrol.

5.12 Hubungan ekspresi protein CYGB dan Nrf2

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein CYGB dengan Nrf2 (Rank-Spearman, $r = 0,889$; $p = 0,000$) yang ditunjukkan pada tabel 4.5. Hal ini berarti peningkatan ekspresi protein CYGB akan meningkatkan ekspresi Nrf2. Penelitian Joey *et al* 2022 menunjukkan bahwa gangguan pada ekspresi CYGB yang banyak ditemukan pada sel melanoma akan membuat disregulasi pada ekspresi protein Nrf2 dan HO-1. Temuan ini dapat dijelaskan melalui keterlibatan Nrf2 dalam biosintesis heme. Beberapa gen yang mempengaruhi jalur biosintesis heme adalah target transkripsi Nrf2. Diduga kadar CYGB endogen yang tinggi membutuhkan kadar basal Nrf2 yang lebih tinggi untuk mempertahankan jumlah biosintesis heme secara adekuat. Di sisi lain, produksi heme yang berlebihan dapat menginduksi jumlah protein HO-1 secara langsung atau secara tidak langsung melalui aktivasi Nrf2.⁹¹

5.13 Hubungan ekspresi protein PDGFA dan CYGB

Hasil analisis statistik korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara ekspresi protein PDGFA dengan CYGB (Rank-Spearman, $r = 0,862$; $p = 0,000$) yang ditunjukkan pada tabel 4.5. Hal ini berarti peningkatan ekspresi protein PDGFA

akan meningkatkan ekspresi CYGB. Hingga saat ini belum ada penelitian yang menghubungkan antara PDGFA dan CYGB pada sel kanker. Namun, hasil ini sejalan dengan regulasi ekspresi CYGB. CYGB merupakan target down stream dari TGF β , PDGF, protein kinase C (PKC) dan persigalan EPO.⁶⁵

5.14 Kelebihan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang pertama dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol gambir terhadap viabilitas sel, dan proliferasi sel serta ekspresi protein Nrf2, CYGB, dan PDGFA pada sel lini kanker HepG2.

5.15 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan diantaranya belum dibuktikan kandungan senyawa aktif dalam EG yang paling berperan dalam menghambat apoptosis, baik jalur intrinsik maupun jalur ekstrinsik pada sel HepG2.

BAB 6

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1. Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini yaitu

1. Pemberian ekstrak etanol gambir konsentrasi 500, 1000, dan 2000 µg/mL dalam waktu 48 jam menurunkan viabilitas dan proliferasi sel HepG2 sejalan dengan peningkatan konsentrasi EG.
2. Pemberian ekstrak etanol gambir konsentrasi 500, 1000, dan 2000 µg/mL dalam waktu 48 jam menurunkan ekspresi protein Cygb, Nrf2, dan PDGFA; dan CYGB pada sel HepG2 sejalan dengan peningkatan konsentrasi EG
3. Terdapat korelasi positif sangat kuat dan bermakna antara viabilitas dan proliferasi sel HepG2 ; CYGB dengan proliferasi sel HepG2; CYGB dengan viabilitas sel HepG2; Nrf2 dengan proliferasi sel HepG2 ; Nrf2 dengan viabilitas sel HepG2; PDGFA dengan proliferasi sel HepG2; PDGFA dengan viabilitas sel HepG2; protein Nrf2 dengan PDGFA; protein CYGB dengan Nrf2; dan protein PDGFA dengan CYGB.

6.2. Saran

Penelitian ini membutuhkan beberapa informasi lanjutan berupa:

1. Penelitian lanjutan untuk mengetahui senyawa aktif yang berperan pada EG dengan melakukan isolasi senyawa lalu dimurnikan dan menentukan strukturnya.
2. Penelitian lanjutan mengenai pengaruh pemberian EG secara *in vivo* pada tikus model hepatoma.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singal AG, Lampertico P, Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: New trends. *J Hepatol*. 2020;72(2):250-61.
2. D. Max Parkin MFBJFPP, PhD. Global Cancer Statistics, 2002. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2002.
3. Danyang Liu. Yonglong Zhang YW, Guoyuan Liu. Activation of AKT pathway by Nrf2/PDGFA feedback loop contributes to HCC progression. *Oncotarget*. 2016;7.
4. Zavattari P, Perra A, Menegon S, Kowalik MA, Petrelli A, Angioni MM, et al. Nrf2, but not beta-catenin, mutation represents an early event in rat hepatocarcinogenesis. *Hepatology*. 2015;62(3):851-62.
5. Indonesia KKR. Laporan Nasional Riskesdas. In: Kesehatan BPdP, editor. 2019.
6. Zhou J, Zhang X, Tang H, Yu J, Zu X, Xie Z, et al. Nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2 (Nrf2) in autophagy-induced hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2020;506:1-8.
7. Zhang M, Zhang C, Zhang L, Yang Q, Zhou S, Wen Q, et al. Nrf2 is a potential prognostic marker and promotes proliferation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*. 2015;15:531.
8. Syarifah S. Anticancer activity of Uncaria gambir Roxb on T47D breast cancer cells. *Journal of Physics*. 2019.
9. Wardana AP, Aminah NS, Kristanti AN, Zahrah HI, Fahmi MZ, Yuliati A, et al. Anticancer activity of Nano Uncaria gambir. *Research Square*. 2022.
10. Musdja MY, Rahman HA, Hasan D. Antioxidant Activity of Catechins Isolate of Uncaria Gambier Roxb in Male Rats. *LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences*. 2018;4(2):34-46.
11. Desdiani D, Rengganis I, Djauzi S, Setiyono A, Sadikin M, Jusman SWA, et al. Fibropreventive and Antifibrotic Effects of Uncaria gambir on Rats with Pulmonary Fibrosis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2022;2022:6721958.
12. .Siti Rusdiana Puspa Dewi AP, Theodorus. The effect of Gambir Extracts (Uncaria Gambir [Roxb.]) as Antiseptic on gingival wound in rats *Dental Journal*. 2018;5.
13. Alshatwi AA. Catechin hydrate suppresses MCF-7 proliferation through TP53/Caspase-mediated apoptosis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29(1):167.
14. Woo Y, Oh J, Kim JS. Suppression of Nrf2 Activity by Chestnut Leaf Extract Increases Chemosensitivity of Breast Cancer Stem Cells to Paclitaxel. *Nutrients*. 2017;9(7).
15. Jusman SWA, Amalia MF, Paramita R, Ningsih S, Fadilah F. Structure-based screening of inhibitor platelet-derived growth factor from ethanol extract of Uncaria gambir (Hunter) Roxb. as an antifibrotic in keloid fibroblast cells. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2022.
16. Stock P, Monga D, Tan X, Micsenyi A, Loizos N, Monga SP. Platelet-derived growth factor receptor- α : a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(7):1932-41.

17. Wei T ZL. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014;5.
18. Jusman SWA. Sitoglobin : /anggota Baru Keluarga Globin Vertebrata. *Eberspapyrus*. 2010;16.
19. Yoshizato K, Thuy le TT, Shiota G, Kawada N. Discovery of cytoglobin and its roles in physiology and pathology of hepatic stellate cells. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2016;92(3):77-97.
20. TC B. Cytoglobin as biomarker in cancer *BioMed Research International*. 2015.
21. Yinghui. CytoglobinA Novel Potential Gene Medicine for Fibrosis and Cancer Therapy. *Current Gene Therapy*.. 2008;8.
22. Thuy LTT, Hai H, Kawada N. Role of cytoglobin, a novel radical scavenger, in stellate cell activation and hepatic fibrosis. *Clin Mol Hepatol*. 2020;26(3):280-93.
23. Amalia MF. Efek Ekstrak Etanol Gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb.) Terhadap Ekspresi Sitoglobin, Elastin, dan desmosin pada Fibroblas Keloid 2022.
24. Munggar IP, Kurnia D, Deawati Y, Julaeha E. Current Research of Phytochemical, Medicinal and Non-Medicinal Uses of *Uncaria gambir* Roxb.: A Review. *Molecules*. 2022;27(19).
25. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*. 2005;66(1):5-29.
26. Rauf A, Rahmawaty, Siregar AZ. The Condition of *Uncaria Gambir* Roxb. as One of Important Medicinal Plants in North Sumatra Indonesia. *Procedia Chemistry*. 2015;14:3-10.
27. Fauza H. Gambier : Indonesia Leading Comordities in The Past. *International Journal on Advanced Science Engineering Information Technology*. 2014;4:6.
28. Perkebunan KPDJ. Budidaya Tanaman Gambir. Jakarta 2012.
29. Andre N. A Review of the Occurrence of Non-Alkaloid Constituents in *Uncaria* Species and Their Structure-Activity Relationships. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2013;1(4).
30. Taniguchi K. Evaluation of gambir quality based on quantitative analysis of polyphenolic constituents. *Yakugaku zasshi*. 2007;5.
31. S N. Efek hepatoprotektor gambir (*Uncaria gambir* (Hunter) Roxb) dalam menghambat pembentukan kolagen dengan menekan TIMP-1 in vivo. Disertasi program doktor ilmu biomedik UI 2015.
32. Desdiani D, Rengganis I, Djauzi S, Setiyono A, Sadikin M, Jusman SWA, et al. In vitro Assay and Study Interaction of *Uncaria gambir* (Hunter) Roxb. as Anti-fibrotic Activity Against A549 Cell Line. *Pharmacognosy Journal*. 2020;12(6):1232-40.
33. Alejandro Forner MR, Jordi Bruix. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*. 2018.
34. Raghunath A, Sundarraj K, Arfuso F, Sethi G, Perumal E. Dysregulation of Nrf2 in Hepatocellular Carcinoma: Role in Cancer Progression and Chemoresistance. *Cancers (Basel)*. 2018;10(12).

35. Nishida N, Nishimura T, Nagasaka T, Ikai I, Goel A, Boland CR. Extensive methylation is associated with beta-catenin mutations in hepatocellular carcinoma: evidence for two distinct pathways of human hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67(10):4586-94.
36. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2010;29(36):4989-5005.
37. Calado RT, Brudno J, Mehta P, Kovacs JJ, Wu C, Zago MA, et al. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. *Hepatology.* 2011;53(5):1600-7.
38. Cleary SP, Jeck WR, Zhao X, Chen K, Selitsky SR, Savich GL, et al. Identification of driver genes in hepatocellular carcinoma by exome sequencing. *Hepatology.* 2013;58(5):1693-702.
39. 39. Chen YW, Klimstra DS, Mongeau ME, Tatem JL, Boyartchuk V, Lewis BC. Loss of p53 and Ink4a/Arf cooperate in a cell autonomous fashion to induce metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 2007;67(16):7589-96.
40. Tischoff I, Tannapfe A. DNA methylation in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008;14(11):1741-8.
41. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology.* 2007;132(7):2557-76.
42. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science.* 2002;296(5573):1644-6.
43. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2007;27(1):55-76.
44. Burdette D, Olivarez M, Waris G. Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 3):681-90.
45. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13).
46. He F, Antonucci L, Karin M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis.* 2020;41(4):405-16.
47. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci.* 2014;39(4):199-218.
48. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal.* 2018;29(17):1727-45.
49. Baird L, Yamamoto M. The Molecular Mechanisms Regulating the KEAP1-NRF2 Pathway. *Mol Cell Biol.* 2020;40(13).
50. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-74.
51. Murakami S, Motohashi H. Roles of Nrf2 in cell proliferation and differentiation. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B):168-78.
52. Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar AP, et al. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* 2018;17:297-314.

53. He F, Antonucci L, Yamachika S, Zhang Z, Taniguchi K, Umemura A, et al. NRF2 activates growth factor genes and downstream AKT signaling to induce mouse and human hepatomegaly. *J Hepatol.* 2020;72(6):1182-95.
54. Pandey P, Khan F, Upadhyay TK, Seungjoon M, Park MN, Kim B. New insights about the PDGF/PDGFR signaling pathway as a promising target to develop cancer therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother.* 2023;161:114491.
55. Dan Cosnita AR, Raica M, Sava MP, Cimpean AM. Gene Expression Profile of Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Platelet-derived Growth Factors (PDGFs) in the Normal Cornea. *In Vivo.* 2021;35(2):805-13.
56. Manzat Saplacan RM, Balacescu L, Gherman C, Chira RI, Craiu A, Mircea PA, et al. The Role of PDGFs and PDGFRs in Colorectal Cancer. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:4708076.
57. Ferician AM, Ferician OC, Cumanas AD, Berzava PL, Nesiu A, Barmayoun A, et al. Heterogeneity of Platelet Derived Growth Factor Pathway Gene Expression Profile Defines Three Distinct Subgroups of Renal Cell Carcinomas. *Cancer Genomics Proteomics.* 2022;19(4):477-89.
58. Cimpean AM, Cobec IM, Ceausu RA, Popescu R, Tudor A, Raica M. Platelet Derived Growth Factor BB: A "Must-have" Therapeutic Target "Redivivus" in Ovarian Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.* 2016;13(6):511-7.
59. Haider N, Larose L. Activation of the PDGFRalpha-Nrf2 pathway mediates impaired adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells lacking Nck1. *Cell Commun Signal.* 2020;18(1):26.
60. Jusman SWA. Sitoglobin: anggota baru keluarga globin vertebrata. *Eberspapyrus.* 2017.
61. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, et al. Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25318-23.
62. Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;299(5):F1120-33.
63. He X, Lv R, Wang K, Huang X, Wu W, Yin L, et al. Cytoglobin exhibits anti-fibrosis activity on liver in vivo and in vitro. *Protein J.* 2011;30(7):437-46.
64. McRonald FE, Risk JM, Hodges NJ. Protection from intracellular oxidative stress by cytoglobin in normal and cancerous oesophageal cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e30587.
65. Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G. Cytoglobin: biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(23):3869-83.
66. Chen H, Zhao X, Meng T. Expression and biological role of cytoglobin in human ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6933-9.
67. Kawada N. Cytoglobin as a Marker of Hepatic Stellate Cell-derived Myofibroblasts. *Front Physiol.* 2015;6:329.

68. Mathai C, Jourdeuil FL, Lopez-Soler RI, Jourdeuil D. Emerging perspectives on cytoglobin, beyond NO dioxygenase and peroxidase. *Redox Biol.* 2020;32:101468.
69. Chakraborty S, John R, Nag A. Cytoglobin in tumor hypoxia: novel insights into cancer suppression. *Tumour Biol.* 2014;35(7):6207-19.
70. Pongsuchart M, Kuchimaru T, Yonezawa S, Tran DTP, Kha NT, Hoang NTH, et al. Novel lymphoid enhancer-binding factor 1-cytoglobin axis promotes extravasation of osteosarcoma cells into the lungs. *Cancer Sci.* 2018;109(9):2746-56.
71. Emara M, Turner AR, Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytoglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer Cell Int.* 2010;10:33.
72. ATCC. HB-8065 Product Sheet - Hep G2 [HEPG2]. 2022.
73. Arzumanyan VA, Kiseleva OI, Poverennaya EV. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci.* 2021;22(23).
74. Donato MT, Tolosa L, Gómez-Lechón MJ. Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. *Protocols in in vitro hepatocyte research.* 2015:77-93.
75. Ayazoglu DemİR E, DemİR S, AlıYazicioĞLu Y. In vitro Cytotoxic Effect of Ethanol and Dimethyl Sulfoxide on Various Human Cell Lines. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi.* 2020;23(5):1119-24.
76. Hajighasemi F. Assessment of Cytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide in Human Hematopoietic Tumor Cell Lines. *Iranian Journal of Blood and Cancer.* 2017;9:6.
77. Truong KD, Nguyen HT-L, Nguyen ST. Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy.* 2020;7(7):3855-9.
78. Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal Biochem.* 2016;508:97-103.
79. Yu Y, Deng Y, Lu BM, Liu YX, Li J, Bao JK. Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy. *Apoptosis.* 2014;19(1):1-18.
80. Tian SF, Yang HH, Xiao DP, Huang YJ, He GY, Ma HR, et al. Mechanisms of neuroprotection from hypoxia-ischemia (HI) brain injury by up-regulation of cytoglobin (CYGB) in a neonatal rat model. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15988-6003.
81. Mukherjee PK. Bioassay-Guided Isolation and Evaluation of Herbal Drugs. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs* 2019. p. 515-37.
82. Berridge MV HP, Tan AS. Tetrazolium dyes tools in cell biology: New insights into their cellular reduction *Biotechnology Annual Review Elsevier.* 2005;11.
83. Jeff Hardin GB, Lewis Kleinsmith. *Becker's World of the Cell* United Kingdom: Pearson; 2022.
84. Adan A KY, Baran Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016;17:1213-21.

85. Yin L, Wei, Y., Wang, WQ. et al. Simultaneous application of BrdU and WST-1 measurements for detection of the proliferation and viability of airway smooth muscle cells. . *biol res.* 2014;47.
86. Chimento A, De Luca A, D'Amico M, De Amicis F, Pezzi V. The Involvement of Natural Polyphenols in Molecular Mechanisms Inducing Apoptosis in Tumor Cells: A Promising Adjuvant in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2).
87. Matteo Landriscina FM, Gabriella Laudiero, and Franca Esposito Adaptation to Oxidative Stress, Chemoresistance and Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 2009;11.
88. Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, Daskoulidou N, Bryan J, Gosney JR, et al. Cytochrome has bimodal: tumour suppressor and oncogene functions in lung cancer cell lines. *Hum Mol Genet.* 2013;22(16):3207-17.
89. Latina A, Viticchie G, Lena AM, Piro MC, Annicchiarico-Petruzzelli M, Melino G, et al. DeltaNp63 targets cytochrome to inhibit oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes and lung cancer. *Oncogene.* 2016;35(12):1493-503.
90. Han N, Zhang YY, Zhang ZM, Zhang F, Zeng TY, Zhang YB, et al. High expression of PDGFA predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2021;100(20):e25932.
91. De Backer J, Lin A, Berghe WV, Bogaerts A, Hoogewijs D. Cytochrome inhibits non-thermal plasma-induced apoptosis in melanoma cells through regulation of the NRF2-mediated antioxidant response. *Redox Biol.* 2022;55:102399.
92. Ningsih S. Efek hepatoprotektor gambir (*Uncaria gambir*(Hunter) Roxb. dalam menghambat pembentukan kolagen dengan menekan TIMP-1 *invivo* 20158.

Lampiran 1. Hasil Identifikasi/Determinasi Tumbuhan Gambir



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 (Indonesian Institute of Sciences)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
 (Research Center for Biology)
 Jl. Raya Jakarta - Bogor Km. 46 Cibinong 16911, Indonesia P.O Box 25 Cibinong
 Telp. (021) 87907636 - 87907604 Fax. 87907612

Nomor : *1045*/IPH.1.02/If.8/VI/2013
 Lampiran : -
 Perihal : *Hasil identifikasi/determinasi Tumbuhan*

Cibinong, 20 Juni 2013

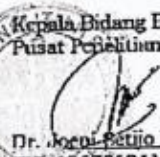
Kepada Yth.
 Bpk./Ibu/Sdr(i). Sri Ningsih
 Gedung BPPT 2 Lantai 15
 Jl. MH Thamrin No. 8 - Jakarta Pusat

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi/determinasi tumbuhan yang Saudara kirimkan ke "Herbarium Bogoriense", Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Bogor, adalah sebagai berikut :

No.	No. Kol.	Jenis	Suku
1	<i>Gambir</i>	<i>Uncaria gambir</i> (Hunter) Roxb.	Rubiaceae

Demikian, semoga berguna bagi Saudara.


 Kepala Bidang Botani
 Pusat Penelitian Biologi-LIPI,
 Dr. Jogen Setiyo Rahajoc
 NIP. 196706241993032001

D:\Idem 2013\Sri Ningsih.docxYr-D8

Page 1 of 1

Lampiran 2. Analisis SPSS Uji IC50 Sel HepG2 terhadap EG berbagai konsentrasi pada waktu 48 Jam

- Uji Normalitas (Shapiro Wilk)

	Tests of Normality					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sel HepG2 Kontrol	.380	4	.	.722	4	.021
Sel HepG2 + EG 2000	.250	4	.	.897	4	.418
Sel HepG2 + EG 1000	.332	4	.	.853	4	.235
Sel HepG2 + EG 500	.298	4	.	.852	4	.233

a. Lilliefors Significance Correction

Semua nilai $p > 0,05$ kecuali sel HepG2 Kontrol ($p = 0,021$ / $p < 0,05$) sehingga semua perlakuan menyebar Normal kecuali Sel HepG2 Normal (Kontrol) sehingga selanjutnya harus dilakukan uji nonparametrik.

- Uji Non-Parametrik (Mann-Whitney) antara kelompok control dan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 2000 $\mu\text{g/mL}$

Test Statistics^a

	% Viabilitas Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: IC50_48

b. Not corrected for ties.

Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,021$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol (Sel HepG2 tanpa penambahan EG) dengan Sel HepG2 yang diberi EG 2000 $\mu\text{g/mL}$.

- **Uji Non-Parametrik (Mann-Whitney) antara kelompok kontrol dan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 1000 µg/mL**

Test Statistics^a

	% Viabilitas Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: IC50_48

b. Not corrected for ties.

Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,021$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol (Sel HepG2 tanpa penambahan EG) dengan Sel HepG2 yang diberi EG 1000 µg/mL .

- **Uji Non-Parametrik (Mann-Whitney) antara kelompok kontrol dan kelompok HepG2 dengan penambahan EG 500 µg/mL**

Test Statistics^a

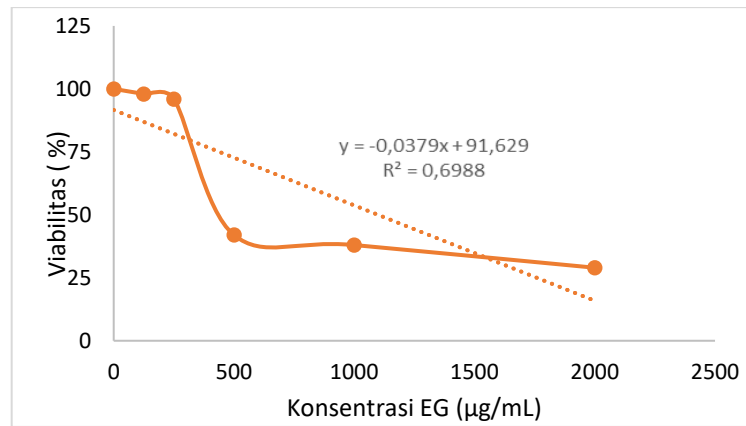
	% Viabilitas Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: IC50_48

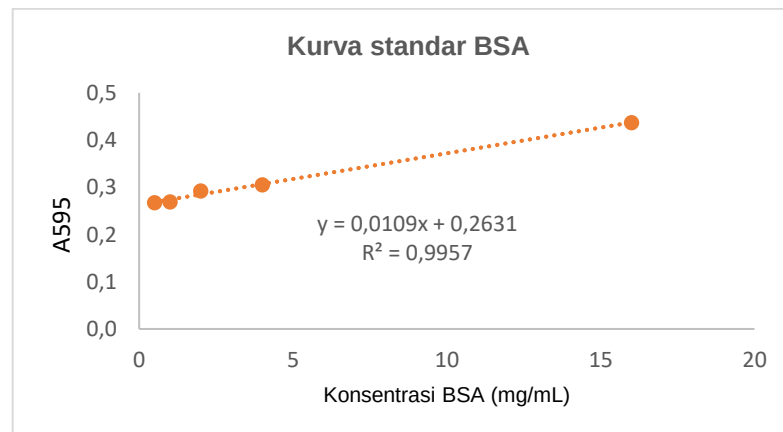
c. Not corrected for ties.

Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,021$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol (Sel HepG2 tanpa penambahan EG) dengan Sel HepG2 yang diberi EG 500 µg/mL.

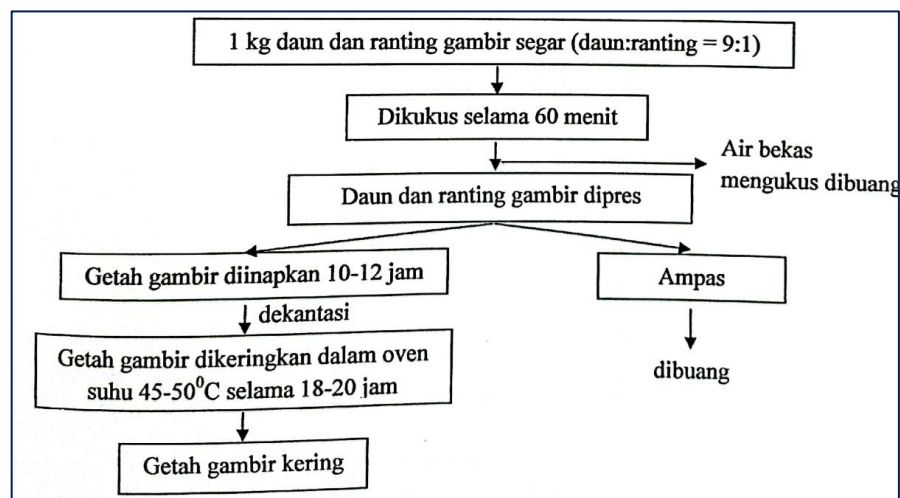
Lampiran 3. Kurva dosis- respons untuk penentuan nilai IC₅₀, Kurva standar BSA dan proses pembuatan getah gambir



Kurva dosis-respons untuk penentuan nilai IC₅₀ EG.

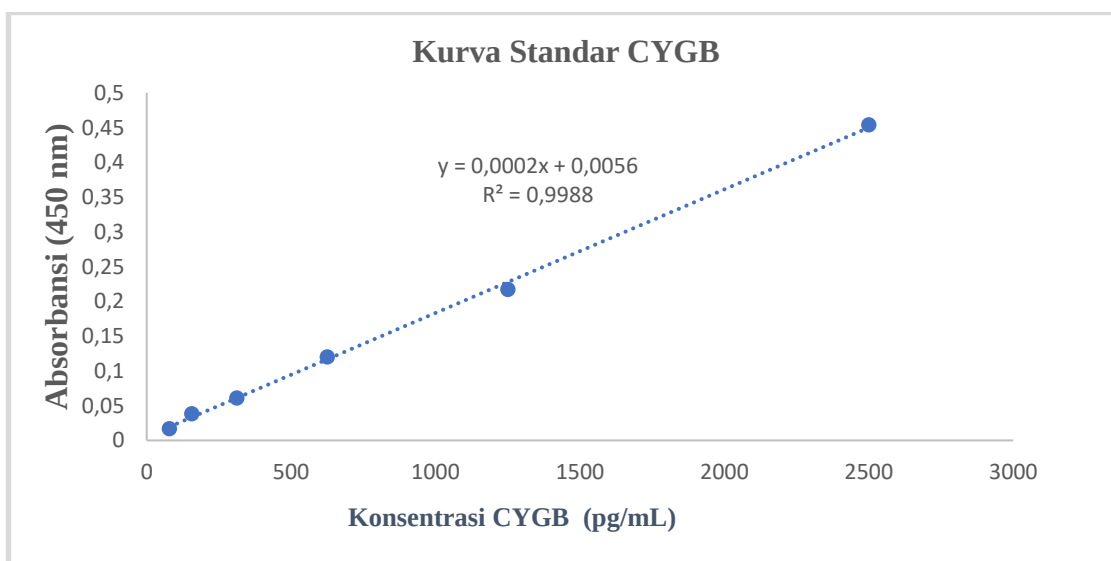


Kurva standar BSA



Proses pembuatan getah gambir kering⁹²

Lampiran 4. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein CYGB



Konsentrasi CYGB (pg/mL)

No	Kontrol (Sel Hep G2 tanpa penambahan EG)	Sel Hep G2 + 500 µg/mL	Sel Hep G2 + 1000 µg/mL	Sel Hep G2 + 2000 µg/mL
1.	24340	18340	4840	3040
2.	25340	17640	4840	2840
3.	27640	16340	4740	2640

Konsentrasi CYGB (pg)/mg protein total

No	Kontrol (Sel Hep G2 tanpa penambahan EG)	Sel Hep G2 + 500 µg/mL	Sel Hep G2 + 1000 µg/mL	Sel Hep G2 + 2000 µg/mL
1.	52,174	41,777	25,60971	17,69613
2.	54,317	40,183	25,60971	16,53191
3.	59,247	37,221	25,08058	15,36769

- Uji Normalitas Protein CYGB (Saphiro-Wilk)

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sel HepG2 Kontrol	.268	3	.	.951	3	.573
Sel HepG2 + EG 500	.245	3	.	.971	3	.672
Sel HepG2 + EG 1000	.385	3	.	.750	3	.000
Sel HepG2 + EG 2000	.175	3	.	1.000	3	1.000

a. Lilliefors Significance Correction

Semua nilai $p > 0,05$ kecuali Sel HepG2 yang diberi EG 1000 µg/mL, artinya semua perlakuan menyebar Normal kecuali Sel HepG2 Normal + EG 1000 µg/mL.

Selanjutnya bisa dilakukan uji nonparametrik Kruskal-Wallis untuk menguji perbedaan antara setiap parameter.

- **Uji Non-Parametrik Protein CYGB (Kruskal-Wallis)**

Test Statistics^{a,b}

	Konsentrasi CYGB/Protein Total Sel HepG2
Kruskal-Wallis H	10.421
df	3
Asymp. Sig.	.015

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: CYGB

Uji Kruskal-Wallis menunjukkan terdapat perbedaan bermakna di antara semua perlakuan ($p = 0,015$ / $p < 0,05$). Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang ada perbedaan bermakna, dilakukan uji per variabel.

- **Uji Mann Whitney antara kelompok Hep G2 dengan penambahan EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan kelompok kontrol**

Test Statistics^a

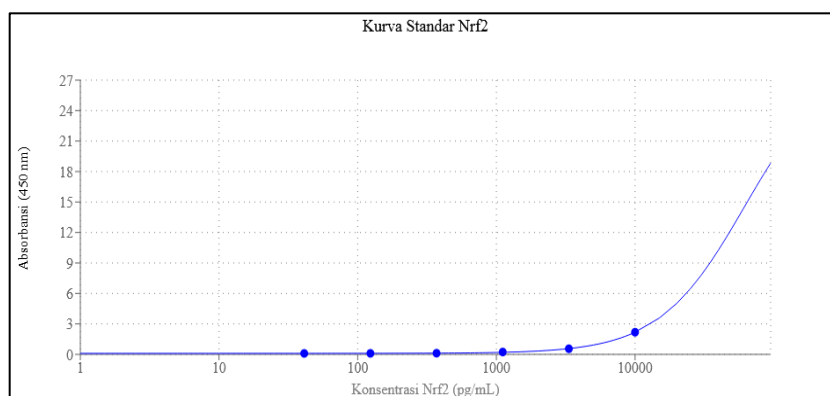
	Konsentrasi CYGB/Protein Total Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.993
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100 ^b

a. Grouping Variable: CYGB

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney karena data Sel HepG2 yang diberi EG 1000 $\mu\text{g/mL}$ tidak menyebar normal. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,046$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol (Sel HepG2 Normal) dengan Sel HepG2 yang diberi EG 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Lampiran 5. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein Nrf2



X_{50} Regression Results [Dataset 1]

Parameter	Value
X_{50}	61848.4612
Equations	(show alternative)
Equation	$Y = 0.0971 + \frac{29.0764 - 0.0971}{1 + \left(\frac{X}{61848.4612} \right)^{-1.4045}}$
Equation Form	$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{X}{X_{50}} \right)^{\text{Hill coefficient}}}$

Konsentrasi Nrf2 (pg/mL)			
Kontrol (Sel Hep G2 tanpa penambahan EG)	Sel Hep G2 + 500 µg/mL	Sel Hep G2 + 1000 µg/mL	Sel Hep G2 + 2000 µg/mL
39988,05	34273,299	4061,541	1792,781
41039,171	34070,413	4177,12	2105,378
41371,674	33459,14	4404,524	2254,738
Konsentrasi Nrf2 (pg)/mg protein total			
Kontrol (Sel Hep G2 tanpa penambahan EG)	Sel Hep G2 + 500 µg/mL	Sel Hep G2 + 1000 µg/mL	Sel Hep G2 + 2000 µg/mL
85,716765	78,072928	21,49068	10,43595
87,969905	77,610764	22,10224	12,25561
88,682645	76,218314	23,30549	13,12504

- Uji Normalitas Protein Nrf2 (Saphiro-Wilk)

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sel HepG2 Kontrol	.284	4	.	.855	4	.243
Sel HepG2 + EG 500	.303	4	.	.790	4	.086

Sel HepG2 + EG 1000	.261	4	.	.829	4	.165
Sel HepG2 + EG 2000	.155	4	.	.993	4	.971

a. Lilliefors Significance Correction

Semua nilai $p > 0,05$, artinya semua perlakuan menyebar Normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varians untuk menentukan uji parametrik atau non parametrik yang digunakan untuk membandingkan parameter.

- **Uji homogenitas – Protein Nrf2**

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
Konsentrasi	Based on Mean	2.316	3	12	.127
Nrf2/Protein Total	Based on Median	1.696	3	12	.221
Sel HepG2	Based on Median	1.696	3	10.040	.230
	and with adjusted df				
	Based on trimmed mean	2.278	3	12	.132

Uji homogenitas varians menunjukkan varians homogen ($p > 0,05$), sehingga bisa dilakukan uji parametrik, berupa uji ANOVA untuk menguji perbedaan antara setiap parameter.

- **Uji Parametrik -One way ANOVA Protein Nrf2**

ANOVA

Konsentrasi Nrf2/Protein Total Sel HepG2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17441.017	3	5813.672	4318.021	.000
Within Groups	16.156	12	1.346		
Total	17457.173	15			

Uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,000 / p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji lanjut (*post hoc*) *Least Significance Different* (LSD) untuk melihat perbedaan antar parameter.

- Uji Post Hoc -LSD test Protein Nrf2

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi Nrf2/Protein Total Sel HepG2

LSD

(I) Nrf2	(J) Nrf2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Sel HepG2 Kontrol	Sel HepG2 + EG 500	9.476327*	.820480	.000	7.68865	11.26400
	Sel HepG2 + EG 1000	64.872791*	.820480	.000	63.08512	66.66046
	Sel HepG2 + EG 2000	75.175784*	.820480	.000	73.38811	76.96346
Sel HepG2 + EG 500	Sel HepG2 Kontrol	-9.476327*	.820480	.000	-11.26400	-7.68865
	Sel HepG2 + EG 1000	55.396464*	.820480	.000	53.60879	57.18414
	Sel HepG2 + EG 2000	65.699457*	.820480	.000	63.91179	67.48713
Sel HepG2 + EG 1000	Sel HepG2 Kontrol	-64.872791*	.820480	.000	-66.66046	-63.08512
	Sel HepG2 + EG 500	-55.396464*	.820480	.000	-57.18414	-53.60879
	Sel HepG2 + EG 2000	10.302993*	.820480	.000	8.51532	12.09067
Sel HepG2 + EG 2000	Sel HepG2 Kontrol	-75.175784*	.820480	.000	-76.96346	-73.38811
	Sel HepG2 + EG 500	-65.699457*	.820480	.000	-67.48713	-63.91179
	Sel HepG2 + EG 1000	-10.302993*	.820480	.000	-12.09067	-8.51532

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

uji *Post Hoc* (LSD) terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,000 / p < 0,05$) pada semua perbandingan.

Lampiran 6. Data Pengukuran ELISA dan Analisis SPSS – Protein PDGFA

- Uji Normalitas (Saphiro-Wilk)

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Sel HepG2 Kontrol	.279	4	.	.939	4	.647
Sel HepG2 + EG 500	.274	4	.	.864	4	.275
Sel HepG2 + EG 1000	.203	4	.	.980	4	.899
Sel HepG2 + EG 2000	.185	4	.	.972	4	.855

a. Lilliefors Significance Correction

Semua nilai $p > 0,05$ artinya semua perlakuan menyebar Normal sehingga bisa dilanjutkan ke uji homogenitas varians.

- Uji homogenitas -Protein PDGFA

Test of Homogeneity of Variances

		Levene	df1	df2	Sig.
		Statistic			
Konsentrasi	Based on Mean	.322	3	12	.810
PDGFA/Protein Total	Based on Median	.258	3	12	.854
Sel HepG2	Based on Median and with adjusted df	.258	3	7.158	.853
	Based on trimmed mean	.307	3	12	.820

Varians homogen ($p > 0,05$), sehingga bisa dilakukan uji ANOVA.

- Uji Parametrik- *One way* ANOVA protein PDGFA

ANOVA

Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.907	3	2.302	91.333	.000
Within Groups	.302	12	.025		
Total	7.209	15			

• **Uji Post-Hoc -LSD test protein PDGFA**
Multiple Comparisons

Dependent Variable: Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2

LSD

(I) PDGFA	(J) PDGFA	Mean	Std.	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
Sel HepG2 Normal	Sel HepG2 Normal + EG 500 ppm	.381768*	.112265	.005	.13716	.62637
	Sel HepG2 Normal + EG 1000 ppm	.846765*	.112265	.000	.60216	1.09137
	Sel HepG2 Normal + EG 2000 ppm	1.759579*	.112265	.000	1.51497	2.00418
Sel HepG2 Normal + EG 500 ppm	Sel HepG2 Normal	-.381768*	.112265	.005	-.62637	-.13716
	Sel HepG2 Normal + EG 1000 ppm	.464997*	.112265	.001	.22039	.70960
	Sel HepG2 Normal + EG 2000 ppm	1.377811*	.112265	.000	1.13321	1.62242
Sel HepG2 Normal + EG 1000 ppm	Sel HepG2 Normal	-.846765*	.112265	.000	-1.09137	-.60216
	Sel HepG2 Normal + EG 500 ppm	-.464997*	.112265	.001	-.70960	-.22039
	Sel HepG2 Normal + EG 2000 ppm	.912813*	.112265	.000	.66821	1.15742
Sel HepG2 Normal + EG 2000 ppm	Sel HepG2 Normal	-1.759579*	.112265	.000	-2.00418	-1.51497
	Sel HepG2 Normal + EG 500 ppm	-1.377811*	.112265	.000	-1.62242	-1.13321
	Sel HepG2 Normal + EG 1000 ppm	-.912813*	.112265	.000	-1.15742	-.66821

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Uji ANOVA menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p = 0,000$ / $p < 0,05$). Kemudian, pada uji *Post Hoc (LSD)* terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara semua perlakuan.

Lampiran 7. Hasil Analisis Statistik Proliferasi HepG2

- Uji normalitas (Saphiro-Wilk)- Proliferasi HepG2

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kontrol	.327	4	.	.769	4	.058
Sel HepG2 + EG 2000 µg/mL	.192	4	.	.971	4	.850
Sel HepG2 + EG 1000 µg/mL	.298	4	.	.849	4	.224
Sel HepG2 + EG 500 µg/mL	.250	4	.	.945	4	.683

a. Lilliefors Significance Correction

Semua nilai $p > 0,05$ artinya semua perlakuan menyebar Normal sehingga bisa dilanjutkan ke uji homogenitas varians.

- Uji homogenitas - Proliferasi HepG2

Test of Homogeneity of Variances					
		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
% Proliferasi Sel HepG2	Based on Mean	4.701	3	12	.022
	Based on Median	1.434	3	12	.281
	Based on Median and with adjusted df	1.434	3	3.270	.378
	Based on trimmed mean	3.777	3	12	.041

Varians tidak homogen ($p < 0,05$), sehingga tidak bisa dilakukan uji ANOVA, dan harus menggunakan uji nonparametrik Kruskal-Wallis.

- Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Kruskal-Wallis)

Test Statistics^{a,b}

% Proliferasi Sel HepG2	
Kruskal-Wallis H	14.180
df	3
Asymp. Sig.	.003

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

Uji Kruskal-Wallis menunjukkan terdapat perbedaan bermakna di antara semua perlakuan ($p = 0,003 / p < 0,05$). Untuk mengetahui perlakuan mana saja yang ada perbedaan bermakna, dilakukan uji per variabel.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Kontrol dan kelompok Hep G2+ EG 2000 $\mu\text{g/mL}$**

Test Statistics ^a	
	% Proliferasi Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

c. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,020$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol dengan Sel HepG2 yang diberi EG 2000 $\mu\text{g/mL}$.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Kontrol dan kelompok Hep G2 + EG 1000 $\mu\text{g/mL}$**

Test Statistics ^a	
	% Proliferasi Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,019$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol dengan Sel HepG2 yang diberi EG 1000 $\mu\text{g/mL}$.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Kontrol dan kelompok Hep G2 + EG 500 µg/mL**

Test Statistics^a

% Proliferasi Sel HepG2	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis.

Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,019$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Kontrol dengan Sel HepG2 yang diberi EG 500 µg/mL.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Hep G2 + EG 2000 µg/mL dan kelompok Hep G2 + EG 1000 µg/mL**

Test Statistics^a

% Proliferasi Sel HepG2	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,020$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Sel HepG2 yang diberi EG 2000 µg/mL dengan Sel HepG2 yang diberi EG 1000 µg/mL.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Hep G2 + EG 2000 µg/mL dan kelompok Hep G2 + EG 500 µg/mL**

Test Statistics^a

	% Proliferasi Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,020$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Sel HepG2 yang diberi EG 2000 µg/mL dengan Sel HepG2 yang diberi EG 500 µg/mL.

- **Uji Non-Parametrik - Proliferasi HepG2 (Mann-Whitney) antara kelompok Hep G2 + EG 1000 µg/mL dan kelompok Hep G2 + EG 500 µg/mL**

Test Statistics^a

	% Proliferasi Sel HepG2
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.337
Asymp. Sig. (2-tailed)	.019
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: % Proliferasi Sel HepG2

b. Not corrected for ties.

Dilakukan uji nonparametrik Mann-Whitney sebagai uji lanjut Kruskal-Wallis. Uji Mann-Whitney menunjukkan nilai $p = 0,020$ ($p < 0,05$), artinya terdapat perbedaan bermakna antara Sel HepG2 yang diberi EG 1000 µg/mL dengan Sel HepG2 yang diberi EG 500 µg/mL.

Lampiran 8. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Viabilitas dan Proliferasi sel HepG2

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% Proliferasi Sel HepG2	.410	12	.000	.648	12	.000
% Viabilitas Sel HepG2	.358	12	.000	.706	12	.001

a. Lilliefors Significance Correction

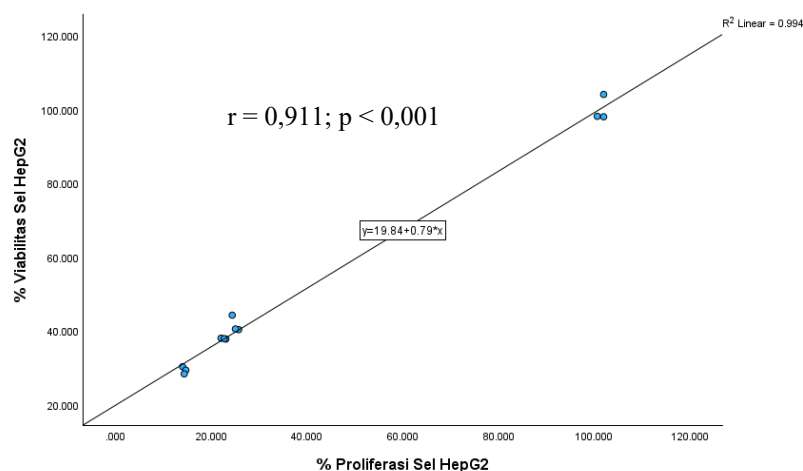
Nilai p % proliferasi adalah 0,000 dan viabilitas sel HepG2 adalah $p = 0,001$ ($p < 0,05$) artinya data % proliferasi dan viabilitas sel HepG2 tidak menyebar Normal sehingga untuk menilai korelasi antar keduanya hanya bisa digunakan uji Rank-Spearman.

Correlations

		% Viabilitas Sel HepG2		% Proliferasi Sel HepG2	
Spearman's rho	% Viabilitas Sel HepG2	Correlation Coefficient	1.000	.911**	
		Sig. (2-tailed)	.	.000	
		N	12	12	
	% Proliferasi Sel HepG2	Correlation Coefficient	.911**	1.000	
		Sig. (2-tailed)	.000	.	
		N	12	12	

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,911$; $p = 0,000$) antara % proliferasi sel HepG2 dengan % viabilitas sel HepG2.



Lampiran 9 . Hasil Analisis Statistik Korelasi antara CYGB dan Proliferasi sel HepG2

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% Proliferasi Sel HepG2	.378	12	.000	.684	12	.001
Ekspresi CYGB	.212	12	.144	.915	12	.246

a. Lilliefors Significance Correction

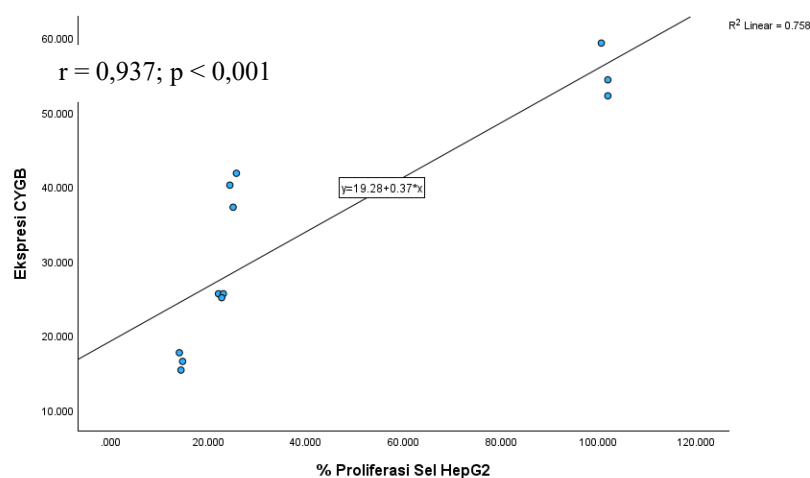
Nilai p % proliferasi sel HepG2 = 0,001 ($p < 0,05$) artinya data % proliferasi sel HepG2 tidak menyebar Normal, sedangkan nilai p ekspresi CYGB = 0,246 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi CYGB menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

Correlations

			% Proliferasi Sel HepG2	Ekspresi CYGB
Spearman's rho	% Proliferasi Sel HepG2	Correlation Coefficient	1.000	.937**
		Sig. (2-tailed)	.	<,001
		N	12	12
	Ekspresi CYGB	Correlation Coefficient	.937**	1.000
Sig. (2-tailed)		<,001	.	
N		12	12	

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,937$; $p < 0,001$) antara % proliferasi sel HepG2 dengan ekspresi CYGB.



Lampiran 10. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Nrf2 dan Proliferasi sel HepG2

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% Proliferasi Sel HepG2	.409	16	<,001	.653	16	,000
Ekspresi Nrf2	.282	16	.001	.765	16	,000

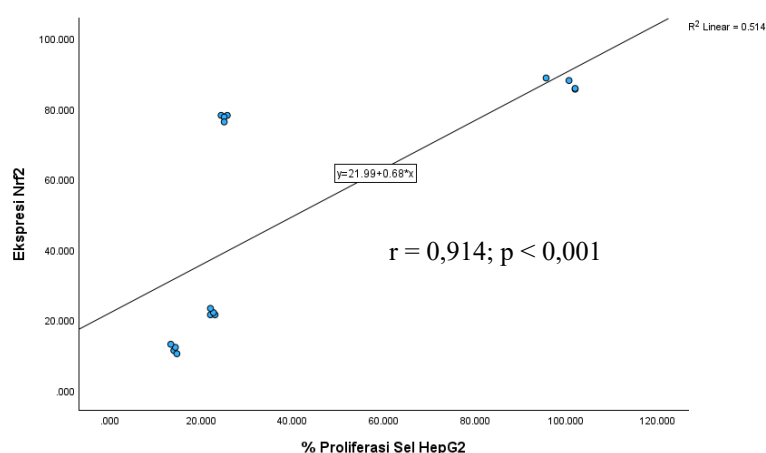
a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p % proliferasi sel HepG2 dan ekspresi Nrf2 adalah 0,000 ($p < 0,05$) artinya data % proliferasi sel HepG2 dan Ekspresi Nrf2 tidak menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

Correlations			% Proliferasi Sel HepG2	Ekspresi Nrf2
Spearman's rho	% Proliferasi Sel HepG2	Correlation Coefficient	1.000	.914**
		Sig. (2-tailed)	.	,000
		N	16	16
	Ekspresi Nrf2	Correlation Coefficient	.914**	1.000
		Sig. (2-tailed)	<,001	.
		N	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,914$; $p < 0,001$) antara % proliferasi sel HepG2 dengan ekspresi Nrf2.



Lampiran 11. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara PDGFA dan Proliferasi sel HepG2

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% Proliferasi Sel HepG2	.409	16	.000	.653	16	.000
Ekspresi PDGFA	.149	16	.200*	.919	16	.162

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

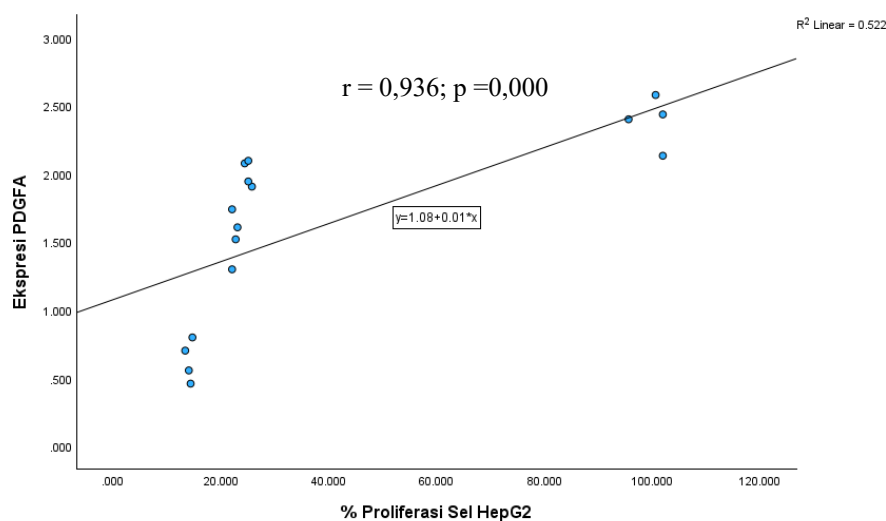
Nilai p % proliferasi sel HepG2 = 0,000 ($p < 0,05$) artinya data % proliferasi sel HepG2 tidak menyebar Normal, sedangkan nilai p ekspresi PDGFA = 0,162 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi PDGFA menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

Correlations

		% Proliferasi Sel HepG2		Ekspresi PDGFA
Spearman's rho	% Proliferasi Sel HepG2	Correlation Coefficient	1.000	.936**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	16	16
	Ekspresi PDGFA	Correlation Coefficient	.936**	1.000
		Sig. (2-tailed)	<,001	.
		N	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,936$; $p = 0,000$) antara % proliferasi sel HepG2 dengan ekspresi PDGFA.



Lampiran 12. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara CYGB dan Viabilitas sel HepG2

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi CYGB	.212	12	.144	.915	12	.246
% Viabilitas Sel HepG2	.358	12	<.001	.706	12	.000

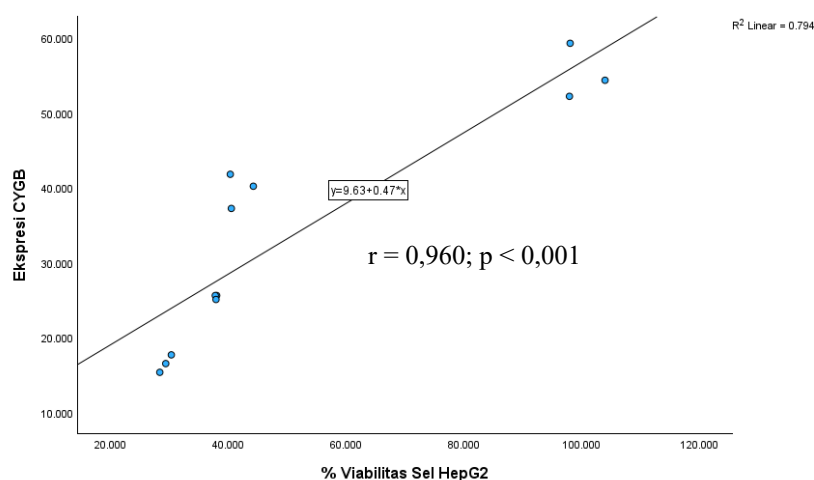
a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p % viabilitas sel HepG2 = 0,000 ($p < 0,05$) artinya data % viabilitas sel HepG2 tidak menyebar Normal, sedangkan nilai p ekspresi CYGB = 0,246 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi CYGB menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

		Correlations		Ekspresi CYGB	% Viabilitas Sel HepG2
Spearman's rho	Ekspresi CYGB	Correlation Coefficient		1.000	.960**
		Sig. (2-tailed)		.	.000
		N		12	12
	% Viabilitas Sel HepG2	Correlation Coefficient		.960**	1.000
		Sig. (2-tailed)		<.001	.
		N		12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,960$; $p = 0,000$) antara % viabilitas sel HepG2 dengan ekspresi CYGB.



Lampiran 13. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Nrf2 dan Viabilitas sel HepG2

	Tests of Normality					
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi Nrf2	.279	12	.010	.771	12	.005
% Viabilitas Sel HepG2	.358	12	<,001	.706	12	.000

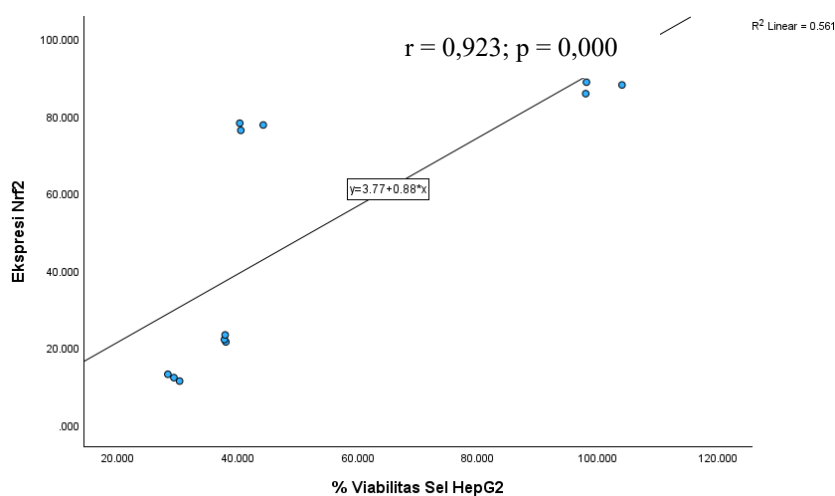
a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p ekspresi Nrf2 = 0,005 ($p < 0,05$) dan % Viabilitas Sel HepG2 = 0,000 ($p < 0,05$) artinya data ekspresi Nrf2 dan % Viabilitas Sel HepG2 tidak menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

		Correlations		Ekspresi Nrf2	% Viabilitas Sel HepG2
Spearman's rho	Ekspresi Nrf2	Correlation Coefficient		1.000	.923**
		Sig. (2-tailed)		.	.000
		N		12	12
	% Viabilitas Sel HepG2	Correlation Coefficient		.923**	1.000
		Sig. (2-tailed)		<,001	.
		N		12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($r = 0,923$; $p = 0,000$) antara ekspresi Nrf2 dengan % Viabilitas Sel HepG2.



Lampiran 14. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara PDGFA dan Viabilitas sel HepG2

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi PDGFA	.154	12	.200*	.910	12	.214
% Viabilitas Sel HepG2	.358	12	<.001	.706	12	.000

*. This is a lower bound of the true significance.

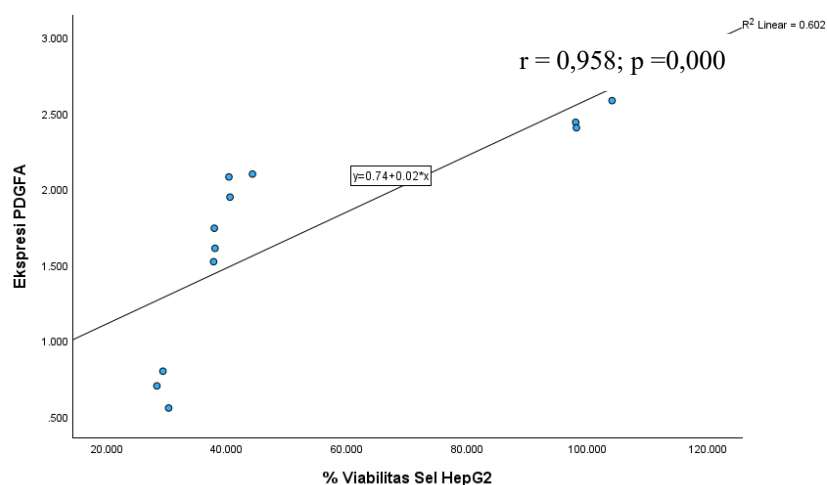
a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p ekspresi PDGFA = 0,214 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi PDGFA menyebar Normal, sedangkan nilai p % viabilitas sel HepG2 = 0,000 ($p < 0,05$) artinya data % viabilitas sel HepG2 tidak menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

Correlations				
		Ekspresi PDGFA		% Viabilitas Sel HepG2
Spearman's rho	Ekspresi PDGFA	Correlation Coefficient	1.000	.958**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	12	12
	% Viabilitas Sel HepG2	Correlation Coefficient	.958**	1.000
		Sig. (2-tailed)	<.001	.
		N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($R = 0,958$; $p = 0,000$) antara ekspresi PDGFA dengan % viabilitas sel HepG2.



Lampiran 15. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara protein CYGB dan Nrf2

- Uji Normalitas (Shaphiro Wilk)

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ekspresi CYGB	.212	12	.144	.915	12	.246
Ekspresi Nrf2	.347	12	.000	.715	12	.001

a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p ekspresi CYGB = 0,246 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi CYGB menyebar Normal, sedangkan nilai p ekspresi Nrf2 = 0,001 ($p < 0,05$) artinya data ekspresi Nrf2 tidak menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

- Uji Korelasi Rank-Spearman antara CYGB dengan Nrf2

Correlations

			Ekspresi CYGB	Ekspresi Nrf2
Spearman's rho	Ekspresi CYGB	Correlation Coefficient	1.000	.889**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	12	12
	Ekspresi Nrf2	Correlation Coefficient	.889**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	12	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($r = 0,889$; $p = 0,000$) antara ekspresi CYGB dengan ekspresi Nrf2.

Lampiran 16. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Ekspresi Protein PDGFA dengan Nrf2

- Uji Normalitas (Shaphiro Wilk)

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2	.149	16	.200*	.919	16	.162
Konsentrasi Nrf2/Protein Total Sel HepG2	.282	16	.001	.765	16	.001

*. This is a lower bound of the true significance.

b. Lilliefors Significance Correction

Nilai p ekspresi PDGFA = 0,162 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi PDGFA menyebar Normal, sedangkan nilai p ekspresi Nrf2 = 0,001 ($p < 0,05$) artinya data ekspresi Nrf2 tidak menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

- Uji Korelasi Rank-Spearman antara CYGB dengan Nrf2

Correlations

			Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2	Konsentrasi Nrf2/Protein Total Sel HepG2
Spearman's rho	Konsentrasi	Correlation Coefficient	1.000	.943**
	PDGFA/Protein Total Sel HepG2	Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	16	16
	Konsentrasi Nrf2/Protein	Correlation Coefficient	.943**	1.000
	Total Sel HepG2	Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	16	16

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($r = 0,943$; $p = 0,000$) antara ekspresi PDGFA dengan ekspresi Nrf2.

Lampiran 17. Hasil Analisis Statistik Korelasi antara Ekspresi Protein PDGFA dengan CYGB

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2	.111	12	.200*	.975	12	.955
Ekspresi CYGB	.212	12	.144	.915	12	.246

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Nilai p ekspresi PDGFA = 0,955 ($p > 0,05$) dan CYGB = 0,246 ($p > 0,05$) artinya data ekspresi PDGFA dan CYGB menyebar Normal, sehingga uji yang bisa digunakan untuk menilai korelasi antar keduanya adalah uji Rank-Spearman.

Correlations			
		Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2	Ekspresi CYGB
Konsentrasi PDGFA/Protein Total Sel HepG2	Pearson Correlation	1	.810**
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	16	12
Ekspresi CYGB	Pearson Correlation	.810**	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	12	12

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji Rank-Spearman, terdapat korelasi positif sangat kuat yang bermakna ($r = 0,810$; $p = 0,001$) antara ekspresi PDGFA dengan ekspresi CYGB.

Lampiran 18. Bukti Acceptance Manuskrip Artikel



JURNAL BIOMEDIKA DAN KESEHATAN

Jalan Kyai Tapa, Grogol (Kampus B), Jakarta 11440, Indonesia

Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti

Telp. 021-5672731 Ext. 2105 | Email: jbiomedkes@trisakti.ac.id

Website: jbiomedkes.org | eISSN: 2621-5470 / pISSN: 2621-539X

LETTER OF ACCEPTANCE

No: 84/USAKTI/GBK/V/2023

19th May 2023

Dear Deasyka Yastani, Novi Silvia H, Sri Widia A. Jusman.

Kindly be informed that your registered article no. 349 by title :

The Role of Cytoglobin in Cancer

Based on the results of the review process, the article will be published in the Jurnal Biomedika dan Kesehatan in Vol. 6 No. 2, August 2023.

Thank you for your attention.

Kindest Regards,

Dr. dr. Husnun Amalia, Sp.M

Chief Editor Jurnal Biomedika dan Kesehatan

Lampiran 19. Bukti Submit dan Presentasi di Seminar Nasional

The screenshot shows the 'Submissions' page of the Acta Biochimica Indonesiana journal. The user 'deasyka' is logged in. The page displays a submission titled 'The role of Nrf2 transcription factors in various physiological and pathological stat...' by Deasyka Yastani. The submission is in the 'My Assigned' queue. A table below the submission shows the status of reviews and revisions.

Icon	Status
📄 0/1	Assigned reviews completed
📄 0	Revisions submitted
💬 0	Open discussions

The certificate is for Dr. Deasyka Yastani, who presented orally at the 2022 PBBMI National Seminar. The seminar was held at the Grand Krakatau Ballroom Swiss-Belhotel in Bandar Lampung on August 25-26, 2022. The certificate is signed by Dr. Dra. Rahmawati Ridwan, Apt., Ms., the General Chairman of PBBMI, and Dr. Si. dr. Syazili Mustofa, M. Biomed, the Chairman of the Organizing Committee. The certificate is supported by Genetika Science.

SERTIFIKAT
 No : 375 / PP-PBBMI/Semnas/VIII/2022
 Sertifikat ini diberikan kepada

dr. Deasyka Yastani

Sebagai
 Presenter Oral

**SEMINAR NASIONAL XXV PBBMI TAHUN 2022
 DIES NATALIS 57 UNIVERSITAS LAMPUNG
 "Sumbangan Biokimia Dan Biologi Molekuler Untuk
 Kemandirian Dan Daya Saing Bangsa"**
 Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia (PBBMI) Cabang Lampung
 Grand Krakatau Ballroom Swiss-Belhotel
 Bandar Lampung, 25-26 Agustus 2022

Dr. Dra. Rahmawati Ridwan, Apt., Ms.
 Ketua Umum PBBMI

Dr. Si. dr. Syazili Mustofa, M. Biomed
 Ketua Pelaksana

Supported by:
 Genetika Science

RIWAYAT HIDUP



Nama lengkap : Deasyka Yastani
 NPM : 2006614260
 Alamat : Jl. Rossini Utara 2 no 29, Cluster
 Rossini, Symphonia, Pagedangan,
 Tangerang Selatan.
 Tempat dan tanggal lahir : Tangerang, 16 November 1988
 Asal Instansi : Biokimia FK Trisakti
 Alamat Instansi : Jl. Kyai Tapa No.1, RW.9, Tomang, Kec. Grogol
 Kota Jakarta Barat, Jakarta 11440
 No. telpon/HP : 0822-1365-4076
 Riwayat Pendidikan :

SD	: SD Dharma Widya Tangerang	Lulus tahun	2000
SMP	: SMP Strada Santa Maria 2 Tangerang	Lulus tahun	2006
SMA	: SMA Perguruan Budhi Tangerang	Lulus tahun	2009
S1	: Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti	Lulus tahun	2012

 Biaya Penelitian : Hibah Penelitian Tesis Magister (PTM) Kemdikbud
 tahun 2022

The Role of Cytoglobin in Cancer

Deasyka Yastani¹, Novi Silvia H^{2,3}, Sri Widia A. Jusman^{2,3*}

¹*Magister Program in Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia*

²*Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia*

³*Center of Hypoxia and Oxidative Stress Studies, Faculty of Medicine Universitas Indonesia, Jakarta 10430, Indonesia*

*Corresponding author: sriwidiaaj@gmail.com

ABSTRAK

Sitoglobin (Cygb) merupakan anggota baru keluarga protein globin, setelah ditemukannya protein globin yang lain seperti hemoglobin (Hb), mioglobin (Mb) dan neuroglobin (Ngb). Cygb diekspresikan di seluruh jaringan mamalia dan terdapat di dalam sel. Cygb telah terbukti berperan penting pada pernapasan sel normal, diantaranya untuk penyimpanan oksigen, pemusnahan reactive oxygen species (ROS), aktivitas oksidase terminal, dan aktivitas antifibrotik. Penelitian terbaru melaporkan Cygb memiliki beberapa implikasi pada kanker. Pada sebagian besar sel kanker, ekspresi Cygb diregulasi oleh hipermetilasi, menunjukkan kontrol epigenetik. Pada sel kanker terjadi down regulation Cygb yang menunjukkan kemungkinan peran sebagai gen penekan tumor. Pada beberapa keganasan terjadi sebaliknya, upregulasi Cygb terjadi kemungkinan dikaitkan dengan adanya resistensi terhadap hipoksia.

Kata kunci: sitoglobin, ROS, fibrosis, kanker

ABSTRACT

Cytoglobin (Cygb) is a new member of the globin protein family, after the discovery of other globin proteins such as hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb), and neuroglobin (Ngb). Cygb is expressed throughout mammalian tissue and present in cells. Since its discovery, many studies have been conducted to understand the functional role of Cygb but so far remains Cygb has been shown to play many respiratory roles of normal cells including oxygen storage, destruction of reactive

oxygen species (ROS), terminal oxidase activity, and antifibrotic activity. Recent research reports of Cygb having several implications for cancer. In most type of cancer cells, Cygb expression is regulated by hypermethylation, indicating epigenetic control. In cancer cells, Cygb downregulation occurs which indicates a possible role as a tumor suppressor gene. In some malignancies the opposite occurs, Cygb upregulation arises likely associated with the presence of resistance to hypoxia.

Keywords: Cygb, oxidative stress, fibrosis, cancer

Introduction

Cytoglobin (Cygb) is a new member of the globin protein family, after the discovery of other globin proteins such as hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb) and neuroglobin (Ngb).¹ In 2001, Kawada et al. identified Cygb in hepatic stellate cells (HSC) which plays an important role in the repair of damaged liver cell tissue.², hence its called as stellate cell activation-associated protein (STAP). Since its discovery, many studies have been conducted to understand the functional role of Cygb but so far remains.³ Cygb is expressed in mammalian cells.^{4,5} Cygb has a more universal role than Hb, Mb, and Ngb, and is found in red blood cells, muscle cells, central nervous system cells⁵, brain, lungs, retina, liver, intestines, and esophagus.⁶

Cygb has been shown to play an important role in normal cell respiration, including oxygen storage, scavage reactive oxygen species (ROS), terminal oxidase activity, and antifibrotic activity.^{7,8} Recent research reports that Cygb has several implications for cancer. In most cancer cells, Cygb expression is regulated by hypermethylation which results in a decreased expression and demonstrates epigenetic control¹⁰, and indicated its possible role as a tumor-suppressing gene (TSG).¹¹ But, in some malignancies the opposite occurs, Cygb upregulation is related to resistance to hypoxia. Based on current research in this area, this review is being conducted to answer the putative role of Cygb in cancer.

Structure of Cygb

Cygb is a globin with 6 coordination bonds (hexacoordinate globin), in contrast to Hb and Mb which are pentacoordinate globins.^{1,5,6} Cygb is a homodimer

which connected by two disulfide bridge. The Cys38 residue of one monomer binds covalently to the Cys83 residue of the other monomer, and vice versa. Mammalian Cygb has the longest amino acid arrangement compared to other globins, consisting of 190 amino acids, while other globins are only about 140-150 amino acids. The amino acid arrangement in Cygb is conserved, the human and mouse Cygb amino acids differ only by 4%.^{6,13}

The molecular weight of Cygb is 20.9 kDa^{6,14,15} Cygb shows a high intrinsic affinity for O₂. The substitution or reduction of the two cysteines in Cygb leads to a reduction of Cygb affinity to O₂. This explains that the cellular redox state affects the structure of Cygb proteins with the formation of S-S bonds or cleavage, thereby affecting the binding of O₂.⁶

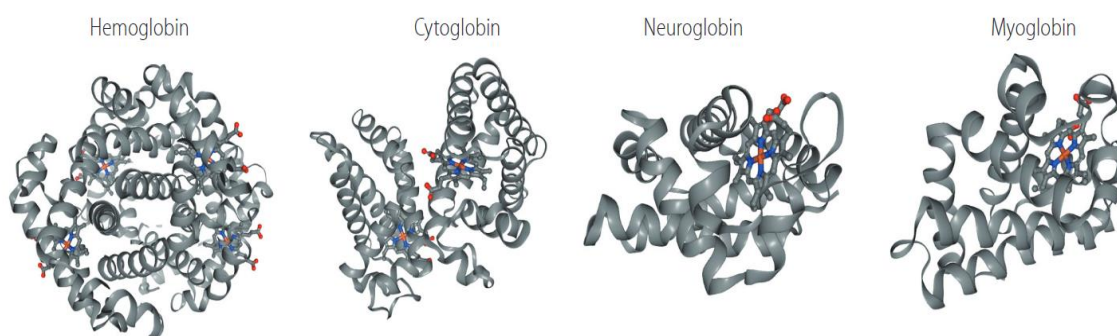


Figure 1. 3D structure to the four members of the globin. Human hemoglobin (RCSB Protein Data Bank accession number: 2HHB, tetramer158), cytoglobin (1V5H, dimer40), neuroglobin (1OJ6, monomer159), and myoglobin (3RGK, monomer160) were shown with alpha-helices group and heme group. The color scheme for the elements: is gray for carbon, red for oxygen, nitrogen blue, and yellow for sulfur.¹⁶

Cygb distribution

The gene encoding Cygb is located on chromosomes 17q25.3 in humans and 11qE2 in mice.¹³ Cygb is expressed throughout mammalian tissue⁴, and is present in cells.^{4,5} Cygb has a more universal role than Hb, Mb, and Ngb, and is found in red blood cells, muscle cells, central nervous system cells⁵, brain, lungs, retina, liver,

intestines, and esophagus.⁶ Cygb expression in some mouse organs is shown in Figure 2.

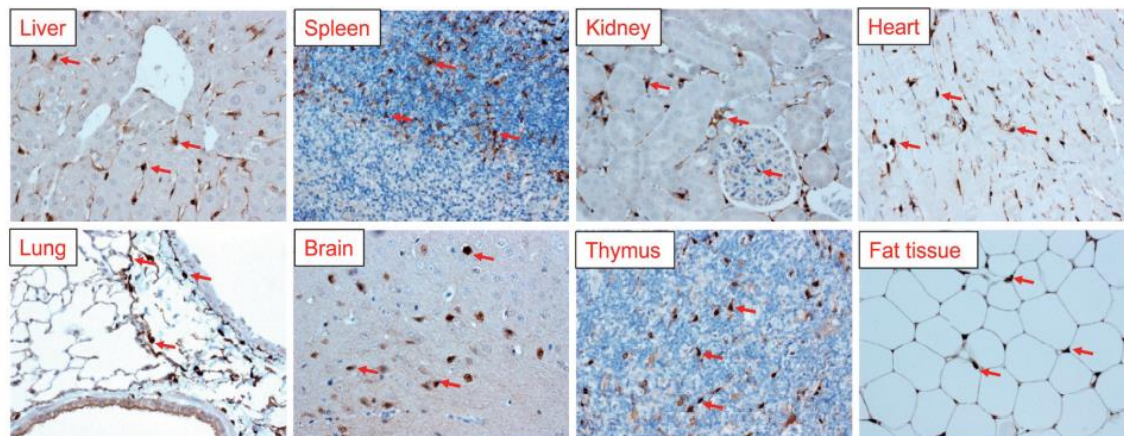


Figure 2. Cygb's expression in some organs of the mouse. Immunohistochemistry staining of Cygb antibodies shows positive Cygb density in all organs. The red arrow in the image shows Cygb's positive cell.⁶

Cygb in the liver was detected in hepatic stellate cells (HSCs),¹⁹ but not in hepatocytes, Kupffer cells (KCs), endothelial cells, or myofibroblasts.²⁰ Cygb expression was also found in stromal cells in the spleen, kidneys, thymus, lungs, and in adipose tissue (Figure 2). In the heart, Cygb expression is found in fibroblasts, but not in cardiomyocytes. Recent studies, showed that Cygb was also found in melanocytes, and the absence of Cygb was associated with a change from melanocytes to melanomas.²¹

At the cellular level,^{1,16,22} Cygb shows increased expression in fibroblast cells line, for example osteoblasts and chondroblasts, which are actively involved in the production of extracellular matrix.²³ In addition, its expression has also been found in neurons, with localization mainly in the cytoplasmic and nuclear. Cygb expression specific to neuron cells shows Cygb has a different role compared to mesenchymal cells.

Regulation of Cygb

Cygb promoter does not have a TATA box, contains a 1.4 kb long CpG island and several possible sites start transcription. Cygb non-encoding sequences are composed of several genes associated with cellular responses to hypoxia, namely hypoxia-responsive elements (HRE), hypoxia-inducible protein binding sites (HIPBS), and some recognition sites with hypoxia-related transcription factors. HREs are composed of a core motif of 50 -RCGTG-30, which is needed to bind hypoxia-inducible factor 1 (HIF1).²⁴

HIF (HIF1, HIF2) is considered as the primary regulator of cellular response to O₂ which regulates the transcription of a large number of genes involved in various metabolic pathways including apoptosis, angiogenesis, proliferation, pH regulation, glycolysis, and O₂ homeostasis and genetic instability. Hypoxia-inducible protein binding site contains protein sites involved in stabilization against hypoxia. Several transcription factors binding sites have been identified in Cygb promoters including HIF1, stimulatory protein 1 (SP1), activator proteins (AP1, AP2), nuclear factors (NF1, NF-kB, NFAT), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), and cellular erythroblastosis of homologous E26 oncogene virus 1 (cETS-1). The binding sites of SP1 and NF-kB are arranged inside the CpG island in the CYGB promoter, playing a role in epigenetic control of Cygb expression.²⁴

NF-kB, AP1 and C/EBP factors play a role in signal transduction associated with hypoxia, oxidative stress, and inflammation. ETS is a proto-oncogene involved in the development of stem cells and senescence pathways. Five transcription factors have been shown to bind and transactivate Cygb promoters. In hypoxic states, it was shown that there was an interaction between HIF 1 and the Cygb promoter but the mutagenesis of HIF1 and the EPO binding motif also proved to be very important in Cygb regulation. Recent studies have shown that NFAT and AP1 induce Cygb expression, mediated by calcineurin signaling.¹³ Calcineurin is a calcium-calmodulin-activated phosphatase that is important in engaging several heart-related gene signaling pathways for developmental regulation, hypertrophic processes, apoptosis, and metabolism. Calcium and calmodulin complexes will activate calcineurin in response to stress conditions such as hypoxia, ischemia, pressure overload, and then activate several transcription factors such as NFAT and AP-1 so that Cygb expression activation occurs.²⁵

In addition, *Cygb* is a downstream target of tumor growth factor β (TGF- β), platelet-derived growth factor, protein kinase C, and EPO signaling. *Cygb* signaling pathways is illustrated in Figure 3.^{13,24}

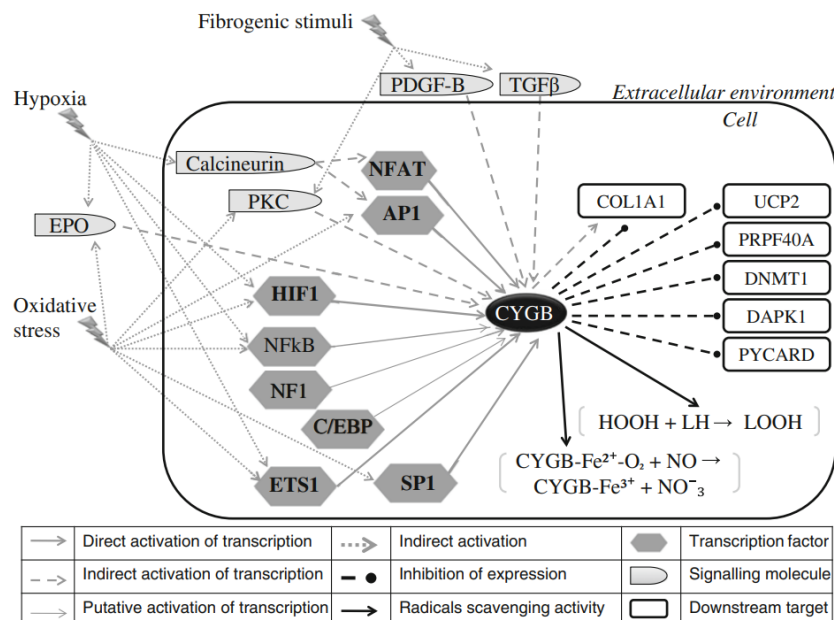


Figure 3. Upstream regulation and downstream targets from *Cygb*¹¹

Upstream regulation of *Cygb* is HIF, AP1, nuclear factors (NF1, NFkB, NFAT), C/EBP, and ETS-1 as responses to hypoxic conditions, oxidative stress, and fibrogenic stimulus.²⁴ *Cygb* expression as a downstream target is TGF- β , PDGF- β , protein kinase C and EPO signaling.¹¹ AP1 : activator proteins, C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein, COL1A1 : collagen 1 α 1, DAPK1 : death associated protein kinase 1, DNMT1 : DNA-methyltransferase 1, EPO: erythropoietin, ETS1 : erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, H₂O₂ : hydrogen peroksida, HIF1 α : hypoxia-inducible factor α , NF1: nuclear factor 1, NFAT: nuclear factor of activated T-cells, NFkB : nuclear factor-kB, NO: nitric oxide, PDGF-B :platelet-derived growth factor, PKC: protein kinase C, PRPF40A : RNA-binding and premRNA processing factor, PYCARD: PYD and CARD domain containing protein, SP1 : stimulatory protein 1, TGF- β : transforming growth factor β , UCP2 : uncoupling protein 2

Cygb expression regulation through upstream signals includes oxidants (hydrogen peroxide, H₂O₂), oxygen pressure (pO₂), growth and inflammatory factors (IL-1 β , FGF2), and cell-to-cell interactions (NOTCH 2 and 3). NOTCH is a membrane-bound transcription factor that is activated in response to ligand binding through cell interactions and is shown to promote *Cygb* expression in smooth

muscle. The effects of O₂, FGF2, and phosphatase calcineurin (PP2B) were experimentally associated with the regulation of transcription factors specifically including HIF1, AP-1, and NFAT. This transcription factor binds to the response element (RE) located within the 1400 base translation initial site (TSS) of the CYGB gene. Although binding motives for ETS1, SP1, and LEF1 have been identified, direct evidence of this transcription factor binding to the promoter element has not been indicated. In contrast, p63 has been shown to interact with response elements but upstream regulators are unknown.

Role of Cygb in cancer

Advances in molecular research into another function of Cygb continue to evolve, namely its ability to suppress tumor growth. The relationship and role of Cygb in cancer were first proposed based on a study of promoter methylation of tissue samples of patients with oral squamous cell carcinoma in 2006. In the study, it was explained that the methylation of promoters at the CpG site increased compared to the control of non-tumor samples. The same thing was found in studies on non-small lung cancer, and neck and head cancer. These studies have shown that a combination of hypermethylation of promoters, loss of heterozygosity, and decreased expression is common in various types of cancer.^{13,18,28}

Research related to Cygb with tumor suppressive activity has been reported since 2006, showing that most cancer cells experience a dramatic decrease in Cygb expression in esophageal cancer.^{1,10} In addition, studies have reported a reduction in tumor growth by excessive expression of Cygb by cDNA cytoglobin transfection in non-small lung cancer cells and breast cancer cells. In another study, knockdown Cygb in glioma cells showed an increase in cell growth rate.^{6,13} In various types of cancer e.g. ovarian, esophageal, pulmonary there was a decrease in expression/downregulation of Cygb.²⁸ The occurrence of gene silencing mechanisms from Cygb is thought to be due to hypermethylation of Cygb promoters. However, inconsistent results occurred in lung cancer line cells that showed an increase in Cygb expression despite hypermethylation of the promoter, which indicated an alternative mechanism of Cygb gene downregulation.¹¹

Cygb overexpression will reduce the expression of several genes such as pre-mRNA processing factor (PRPF40A), uncoupling protein-2 (UCP2), collagen,

type I, alpha 1 (COL1A1), and DNA methyl transferase 1 (DNMT1).²⁸ UCP-2 (mitochondrial uncoupling protein) is involved in suppressing ROS and is also involved in the occurrence of chemoresistance in cancer.³⁶ Regulatory disorders of PRPF-40 AND COL1A1 have also been reported to occur in various types of cancer.³⁷ DNMT1 plays a role in the development of malignancy. Research shows that miR29b and miR133 cause a decrease in the expression of COL1A1 and UCP2. This is also supported because miRNA is involved in a wide variety of cancers, so research related to the exploration of miRNA's involvement in Cygb regulatory networks still needs to be developed.²⁸ Possible mechanisms of Cygb in tumor development and oncogenic progression are described in Figure 4.

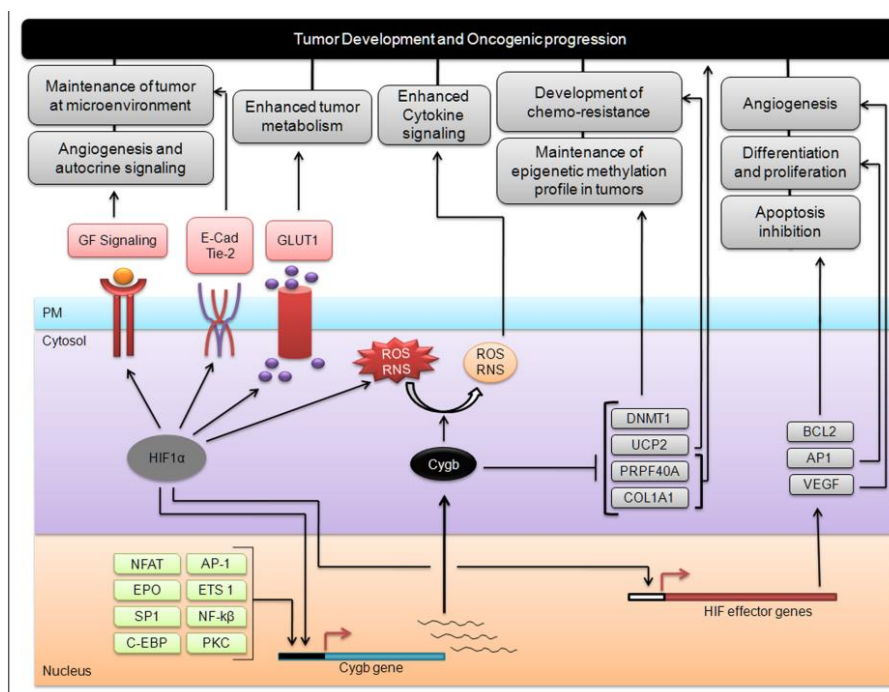


Figure 4. Possible mechanism of action of Cygb as a tumor suppressant.²³

HIF1 α serves as a cellular response to hypoxia. It demonstrates the mechanism of tumor development by inducing the expression of genes involved in abnormal growth, angiogenesis, metastasis, apoptotic resistance, tumor cell metabolism, and the maintenance of stable deviant cells in the tumor microenvironment. It also inhibits other oncogenic factors such as DNMT1, UCP2, PRPF40A, and COL1A1.

Janus faces from Cygb

Several in vitro studies have shown dysregulation of Cygb expression in some cancer line cells and the presence of an inverse effect from before, namely the occurrence of excessive expression of Cygb. Cygb expression is upregulated in several types of cancers such as alveolar soft part sarcoma, lung carcinoma, and head-neck cancer^{37,38}, convinced researchers to speculate Cygb's function is highly contrasting and complex. Recently, the role of Cygb bimodal has been proposed in which Cygb is said to exhibit tumor suppressive function in normoxia but behaves like an oncogene under stressful conditions. Cytoprotective role of Cygb can lead to carcinogenesis or aggressiveness by protecting tumor cells from oxidative injury. Brantley et al. showed that partial agonists of aryl hydrocarbon receptor (AhR) 5F 203 may promote Cygb expression in triple-negative cancer cells and silencing of Cygb can partially inhibit the pro-apoptosis effects of 5F 203.¹³

The consensus concerning Cygb levels in cancer-line cells and their underlying molecular mechanisms is very difficult to explain. This is more confusing when considering the bimodal response associated with Cygb expression.³⁹ Upregulation of Cygb after hypoxia can trigger the adaptation of cancer cells to grow in a hypoxic state.^{17,28} Pongsuchart et al. showed that Cygb expression in osteosarcoma cancer line cells can increase cell extravasation and a knockdown was subsequently found to be the opposite effect that showed that Cygb played a role in promoting metastases.³⁸

Research shows Cygb's involvement in the down-regulation of caspase 2 and 3 to inhibit the occurrence of apoptosis in the brains of neonatal rats induced by hypoxia.³⁴ Cygb's oncogenic function is thought to be due to the protective effect of Cygb in the mechanism against ROS annihilation shown in figure 5. Understanding the regulation of ROS in normal and cancerous cells is very important because cancer cells require a moderate level of ROS for oncogenic development, a modified form of Cygb (mutant or post-translational modified variant) can be hypothesized to function as a "regulated ROS scavenger".

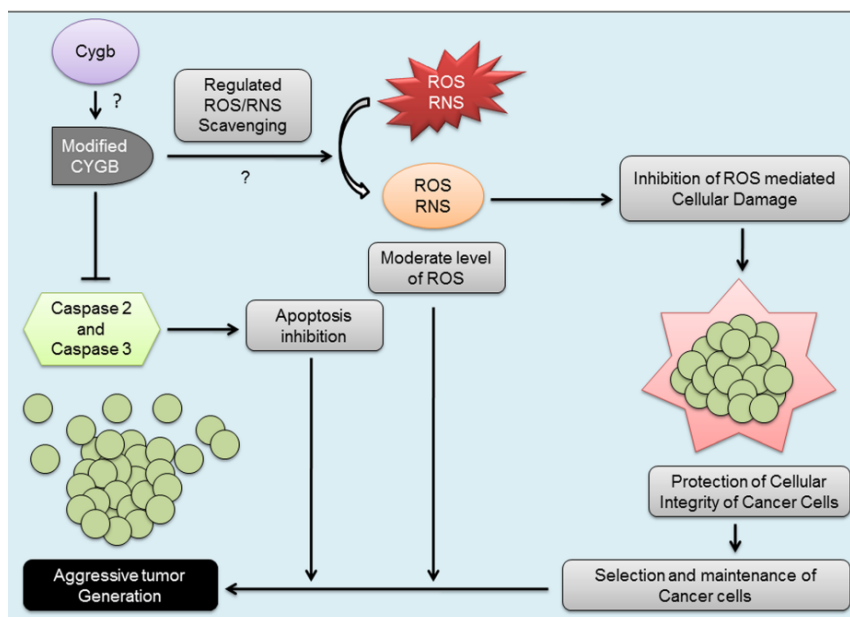


Figure 5. Possible Cygb oncogenic function.²³

Modifications to Cygb may lead to the development of its oncogenic functions. Lower O₂ binding affinity, ROS activity, and/or nitric oxide dioxygenase activity impaired due to structural or post-translational modifications may alter its function in such a way as to make Cygb a strong oncogenic factor. Cygb's oncogenic function can be describe through its ability to inhibit apoptosis factors such as caspase 2/3. Another way to help cancer cells is through their innate ability to annihilate ROS and RNS, thus protecting cellular populations in tumors from damage.

So it can be concluded that the alleged oncogenic function and tumour suppressor activity of Cygb shown in Figure 6.¹¹ Down regulation of Cygb as a tumour suppressor gene in figure 6 is shown to be influenced by various factors. Oncogenic function causes chemoresistance, cancer cell development, and aggressive phenotypes. The occurrence of downregulation of Cygb will also lead to the initiation of cancer cells.¹¹

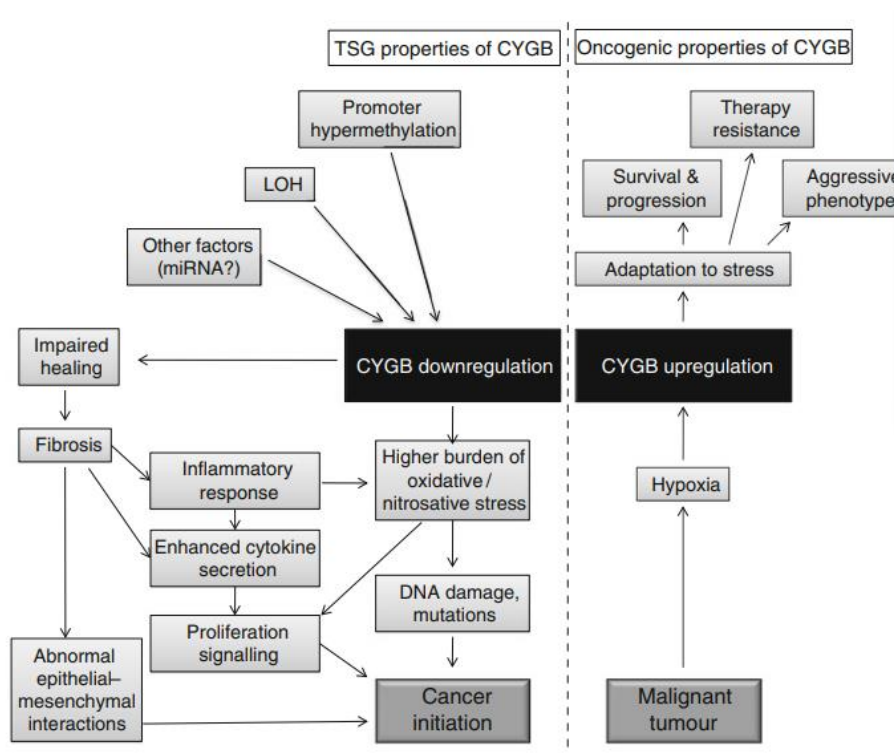


Figure 6 The alleged oncogenic function and tumor suppressor activity of Cygb.¹¹ Cygb expression can occur downregulation as a tumor suppressor gene or upregulation as an oncogenic function in this image influenced by various factors. The oncogenic function causes chemoresistance, cancer cell development, and aggressive phenotypes. The occurrence of downregulation of Cygb will also lead to the initiation of cancer cells. LOH: loss of heterozygosity. ¹¹

Conclusion

In 2001 Cygb was identified by Kawada et al in hepatic stellate cells (HSC) which play an important role in the repair of damaged liver cell tissue, therefore referred as stellate cell activation-associated protein (STAP). Cygb is a globin with 6 coordination bonds (hexacoordinate globin). The gene encoding Cygb is located on chromosomes 17q25.3 in humans and 11qE2 in mice. Cygb is expressed throughout the tissues of mammals and is present in cells.

Cygb expression is regulated through upstream signals includes oxidants (hydrogen peroxide, H_2O_2), oxygen pressure (O_2), growth and inflammatory factors (IL-1 β , FGF2), and cell-to-cell interactions (NOTCH 2 and 3). In addition, Cygb is a down stream target of tumor growth factor b (TGF-b), platelet-derived growth factor, protein kinase C, and EPO signaling. The potential functional roles of Cygb

include the signaling of NO and nitrites, as antioxidants, regulation of apoptosis, and regulation of fibrogenesis.

Recent research reports Cygb has several implications for cancer. In most cancer cells, Cygb expression is regulated by hypermethylation, indicating epigenetic control. In cancer cells, Cygb down-regulation occurs which indicates a possible role as a tumor suppressor gene. But, in some malignancies the opposite occurs, Cygb upregulation is related to resistance to hypoxia which shows Cygb has two sides or Janus faces related to its role in cancer cells.

Acknowledgment

I am grateful to Dr. dr. Novi Silvia H, M. Biomed, and Prof. Sri Widia A. Jusman (University of Indonesia from Biochemistry Department) for valuable discussions.

Funding

This research supported by Hibah Penelitian Tesis Magister Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi (Kemendikbudristek) year 2022

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest

References

1. Jusman SW. Sitogloblin: anggota baru keluarga globin vertebrata. Ebers Papyrus. 2017.
2. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, et al. Characterization of a Stellate Cell Activation-associated Protein (STAP) with Peroxidase Activity Found in Rat Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul 6;276(27):25318–23.
3. Bholah TC, Neergheen-Bhujun VS, Hodges NJ, Dyll SD, Bahorun T. Cytoglobin as a Biomarker in Cancer: Potential Perspective for Diagnosis and Management. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
4. Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G. Cytoglobin: Biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 3869–83.
5. Bholah TC, Neergheen-Bhujun VS, Hodges NJ, Dyll SD, Bahorun T. Cytoglobin as a Biomarker in Cancer: Potential Perspective for Diagnosis and Management. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
6. Thuy LTT, Hai H, Kawada N. Role of cytoglobin, a novel radical scavenger, in stellate cell activation and hepatic fibrosis. Vol. 26, *Clinical and Molecular Hepatology*. Korean Association for the Study of the Liver; 2020. p. 280–93.
7. Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an antifibrotic role in the kidney. *J Physiol Renal Physiol* [Internet]. 2010;299:1120–33. Available from: <http://www.ajprenal.org>
8. He X, Lv R, Wang K, Huang X, Wu W, Yin L, et al. Cytoglobin exhibits anti-fibrosis activity on liver in vivo and in vitro. *Protein Journal*. 2011 Oct;30(7):437–46.
9. Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, et al. Neuroglobin and cytoglobin Fresh blood for the vertebrate globin family. Vol. 3, 1146 *EMBO reports*. 2002.
10. McRonald FE, Risk JM, Hodges NJ. Protection from intracellular oxidative stress by cytoglobin in normal and cancerous oesophageal cells. *PLoS One*. 2012 Feb 16;7(2).
11. Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G. Cytoglobin: Biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 3869–83.
12. Chen H, Zhao X, Meng T. Expression and biological role of cytoglobin in human ovarian cancer. *Tumor Biology*. 2014;35(7):6933–9.
13. Mathai C, Jourd’heuil FL, Lopez-Soler RI, Jourd’heuil D. Emerging perspectives on cytoglobin, beyond NO dioxygenase and peroxidase. Vol. 32, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2020.
14. Kawada N. Cytoglobin as a marker of hepatic stellate cell-derived myofibroblasts. *Front Physiol*. 2015;6(NOV):1–8.
15. Bholah TC, Neergheen-Bhujun VS, Hodges NJ, Dyll SD, Bahorun T. Cytoglobin as a Biomarker in Cancer: Potential Perspective for Diagnosis and Management. Vol. 2015, BioMed Research International. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
16. Thuy LTT, Hai H, Kawada N. Role of cytoglobin, a novel radical scavenger, in stellate cell activation and hepatic fibrosis. Vol. 26, *Clinical and Molecular Hepatology*. Korean Association for the Study of the Liver; 2020. p. 280–93.

17. Burmester T, Gerlach F, Hankeln T. Regulation and role of neuroglobin and cytoglobin under hypoxia. 2022
18. Carpenter M. The expression profile of cytoglobin in human fibrotic lung, and the protective role of cytoglobin in hypoxia and oxidative stress in vitro. 2009.
19. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, et al. Characterization of a Stellate Cell Activation-associated Protein (STAP) with Peroxidase Activity Found in Rat Hepatic Stellate Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jul 6;276(27):25318–23.
20. Motoyama H, Komiya T, Thuy LTT, Tamori A, Enomoto M, Morikawa H, et al. Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver. *Laboratory Investigation*. 2014 Feb;94(2):192–207.
21. Fujita Y, Koinuma S, de Velasco MA, Bolz J, Togashi Y, Terashima M, et al. Melanoma transition is frequently accompanied by a loss of cytoglobin expression in melanocytes: A novel expression site of cytoglobin. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4).
22. Yoshizato K, Thuy LTT, Shiota G, Kawada N, Kunihiko Suzuki MJA. Discovery of cytoglobin and its roles in physiology and pathology of hepatic stellate cells. Vol. 92, *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. Japan Academy; 2016. p. 77–97.
23. Chakraborty S, John R, Nag A. Cytoglobin in tumor hypoxia: Novel insights into cancer suppression. Vol. 35, *Tumor Biology*. IOS Press BV; 2014. p. 6207–19.
24. Oleksiewicz U, Liloglou T, Field JK, Xinarianos G. Cytoglobin: Biochemical, functional and clinical perspective of the newest member of the globin family. Vol. 68, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2011. p. 3869–83.
25. Singh S, Manda SM, Sikder D, Birrer MJ, Rothermel BA, Garry DJ, et al. Calcineurin activates cytoglobin transcription in hypoxic myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Apr 17;284(16):10409–21.
26. Bholah TC, Neergheen-Bhujun VS, Hodges NJ, Dyll SD, Baborun T. Cytoglobin as a Biomarker in Cancer: Potential Perspective for Diagnosis and Management. Vol. 2015, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2015.
27. Thuy LTT, Hai H, Kawada N. Role of cytoglobin, a novel radical scavenger, in stellate cell activation and hepatic fibrosis. Vol. 26, *Clinical and Molecular Hepatology*. Korean Association for the Study of the Liver; 2020. p. 280–93.
28. Chakraborty S, John R, Nag A. Cytoglobin in tumor hypoxia: Novel insights into cancer suppression. Vol. 35, *Tumor Biology*. IOS Press BV; 2014. p. 6207–19.
29. Liu X, Tong J, Zweier JR, Follmer D, Hemann C, Ismail RS, et al. Differences in oxygen-dependent nitric oxide metabolism by cytoglobin and myoglobin account for their differing functional roles. *FEBS Journal*. 2013 Aug;280(15):3621–31.
30. Liu X, Follmer D, Zweier JR, Huang X, Hemann C, Liu K, et al. Characterization of the function of cytoglobin as an oxygen-dependent regulator of nitric oxide concentration. *Biochemistry*. 2012 Jun 26;51(25):5072–82.
31. Zhang S, Li X, Jourdain FL, Qu S, Devejian N, Bennett E, et al. Cytoglobin Promotes Cardiac Progenitor Cell Survival against Oxidative Stress via the Upregulation of the NFκB/iNOS Signal Pathway and Nitric Oxide Production. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).

32. Singh S, Canseco DC, Manda SM, Shelton JM, Chirumamilla RR, Goetsch SC, et al. Cytooglobin modulates myogenic progenitor cell viability and muscle regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1).
33. Randi EB, Vervaet B, Tsachaki M, Porto E, Vermeylen S, Lindenmeyer MT, et al. The antioxidative role of cytooglobin in podocytes: Implications for a role in chronic kidney disease. Vol. 32, *Antioxidants and Redox Signaling*. Mary Ann Liebert Inc.; 2020. p. 1155–71.
34. Tian SF, Yang HH, Xiao DP, Huang YJ, He GY, Hai-Ran M, et al. Mechanisms of neuroprotection from hypoxia-ischemia (HI) brain injury by up-regulation of cytooglobin (CYGB) in a neonatal rat model. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 May 31;288(22):15988–6003.
35. Lv Y, Wang Q, Diao Y, Xu R. CytooglobinA Novel Potential Gene Medicine for Fibrosis and Cancer Therapy. Vol. 8, *Current Gene Therapy*. 2008.
36. Derdak Z, Mark NM, Beldi G, Robson SC, Wands JR, Baffy G. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):2813–9.
37. Emara M, Turner AR, Allalunis-Turner J. Hypoxic regulation of cytooglobin and neuroglobin expression in human normal and tumor tissues. *Cancer Cell Int*. 2010 Sep 9;10.
38. Pongsuchart M, Kuchimaru T, Yonezawa S, Tran DTP, Kha NT, Hoang NTH, et al. Novel lymphoid enhancer-binding factor 1-cytooglobin axis promotes extravasation of osteosarcoma cells into the lungs. *Cancer Sci*. 2018 Sep 1;109(9):2746–56.
39. Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, Daskoulidou N, Bryan J, Gosney JR, et al. Cytooglobin has bimodal: Tumour suppressor and oncogene functions in lung cancer cell lines. *Hum Mol Genet*. 2013 Aug;22(16):3207–17.