

### 3. Menguji Doktor

#### KODE K08

DESKRIPSI	: Penguji Tertutup	Halaman
	: a.n Anny Setijo Rahaju, dr., SpPA(K)	
BUKTI	: Undangan Wadek I .....	02
	: ST WD I FK No 5346/UN3.1.1/ DL/2021, tanggal 13 Okt 2021 .....	03
	: Bukti kinerja yaitu hal sampul, hal pengesahan dll .....	04



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131  
Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472  
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

Nomor : 6546/UN3.1.1/DL/2021

13 Oktober 2021

Lamp : Tiga Berkas

Hal : Mohon Kesediaan untuk menjadi Panitia Penguji Disertasi (Ujian Tertutup)

Yth.

1. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs.,M.Si (Ketua)
2. Prof. Dr. Doddy Moesbadianto Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U(K)
3. Lukman Hakim, dr.,Sp.U, MARS.,Ph.D
4. Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si
5. Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D
6. Dr. Karyono Mintaroem, dr.,Sp.PA
7. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes
8. **Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes**

Dengan hormat,

Sehubungan dengan selesainya penulisan disertasi peserta Program Doktor angkatan tahun 2016/2017,

Nama : Anny Setijo Rahaju, dr.,Sp.PA(K)

ELPT : 507

NIM : 011617017336

Judul : MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP SEL KARSINOMA UROTHELIAL KANDUNG KEMIH (CELL LINE 5637) MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK

Promotor : Prof. Dr. Doddy Moesbadianto Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U(K)

Ko-Promotor I : Lukman Hakim, dr.,Sp.U, MARS.,Ph.D

Ko-Promotor II : Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si

Ujian Disertasi rencananya diselenggarakan :


Hari, Tanggal : Rabu, 27 Oktober 2021

Pukul : 13.00 – 16.00 WIB

Tempat : Menguji secara daring menggunakan aplikasi zoom

Maka dengan ini mohon kesediaan Saudara untuk menjadi Ketua / Anggota panitia Penguji Disertasi tersebut, terlampir kami sampaikan pernyataan kesediaan untuk diisi dan dilampirkan pada kami dalam waktu yang tidak terlalu lama guna diproses lebih lanjut.

Demikian atas perhatian Saudara, kami ucapkan terima kasih.

a.n Dekan  
Wakil Dekan I,  
  
Dr. Achmad Chusnu Romdhoni, dr., Sp. THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009

Tindakan :

- Kepala Sub. Bagian Keuangan



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,  
RISET DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Kampus A Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya, Indonesia 60131  
Telp. (031)5020251, 5030252-3, Fax (031)5022472  
Laman : <http://www.fk.unair.ac.id>, e-mail : [dekan@fk.unair.ac.id](mailto:dekan@fk.unair.ac.id)

**SURAT TUGAS**

Nomor : 5346 /UN3.1.1/DL/2021


Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dengan ini menugaskan :

- |  |         |
|--|---------|
| 1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs.,M.Si                     | Ketua   |
| 2. Prof. Dr. Doddy Moesbadianto Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U(K) | Anggota |
| 3. Lukman Hakim, dr.,Sp.U, MARS.,Ph.D                        | Anggota |
| 4. Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si                              | Anggota |
| 5. Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D                           | Anggota |
| 6. Dr. Karyono Mintaroem, dr.,Sp.PA                          | Anggota |
| 7. Dr. H. Budi Utomo, dr., M.Kes                             | Anggota |
| 8. <b>Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes</b>                    | Anggota |

Sebagai Ketua / Anggota Panitia Ujian Tahap Pertama (Tertutup) Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga atas nama Anny Setijo Rahaju, dr.,Sp.PA(K) peserta Program Doktor Program Studi Ilmu Kedokteran angkatan tahun 2016/2017 yang diselenggarakan pada tanggal 27 Oktober 2021.

Surat tugas ini diterbitkan sementara untuk menunggu keluarnya Surat Keputusan dari Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Surabaya, 13 Oktober 2021

a.n Dekan  
Wakil Dekan I,  


Dr. Achmad Chusnu Romdhoni, dr., Sp. THT-KL(K), FICS  
NIP. 197609022008011009

**DISERTASI**

**MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP SEL  
KARSINOMA UROTHELIAL KANDUNG KEMIH  
(CELL LINE 5637) MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK**



**ANNY SETIJO RAHAJU**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

**MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP  
SEL KARSINOMA UROTHELIAL KANDUNG KEMIH  
(CELL LINE 5637) MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK**

**DISERTASI**

Untuk memperoleh Gelar Doktor  
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
dan dipertahankan dihadapan Panitia Ujian

Tanggal : 27  
Bulan : Oktober  
Tahun : 2021

Olch :

**ANNY SETIJO RAHAJU**  
**011617017336**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP SEL KARSINOMA  
UROTHELIAL KANDUNG KEMIH (CELL LINE 5637)  
MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK

TELAH DISETUJUI  
PADA TANGGAL 5 OKTOBER 2021  
Oleh

Promotor



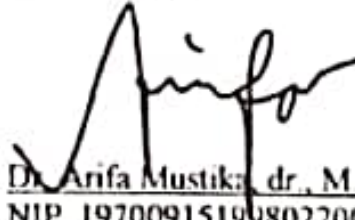
Prof. Dr. Doddy M. Soebadi, dr., SpB., SpU(K)  
NIP. 194909061977031001

Ko Promotor 1



Lukman Hakim, dr., MARS, PhD, SpU(K)  
NIP. 197308092008011006

Ko Promotor 2



Dr. Arifa Mustika, dr., M Si  
NIP. 197009151998022001

Mengetahui :  
KPS Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga



Prof. Dr. Hendy Hendaro, dr., SpOG(K)  
NIP. 196108172016016101

**Penilaian Naskah Disertasi ini telah disetujui untuk diuji dan dinilai  
oleh panitia Ujian Tahap I (Tertutup)  
pada tanggal 27 Oktober 2021**

**Panitia penguji :**

- Ketua** : 1. Prof. Dr. I Ketut Suidiana, Drs., MSi
- Anggota** : 2. Prof. Dr. Doddy M. Soebadi, dr., SpB., SpU(K)
3. Lukman Hakim, dr., MARS, Ph.D, SpU(K)
4. Dr. Arifa Mustika, dr., M Si
5. Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph D
6. Dr. Gondo Mastutik, drh., M Kes.
7. Dr. H. Budi utomo, dr., M Kes
8. Dr. Karyono Mintaroem, dr., SpPA

## RINGKASAN

### MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP SEL KARSINOMA UROTHELIAL KANDUNG KEMIH (CELL LINE 5637) MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK

Karsinoma kandung kemih (KKK) adalah keganasan paling umum pada saluran kemih dan salah satu kanker penyebab kematian pada pria dewasa. Data dari *Global Cancer Statistic* (GLOBOCAN) 2018 menempatkan kanker kandung kemih di peringkat ke-10 kanker dengan angka kejadian terbesar di seluruh dunia. Terapi standar karsinoma kandung kemih saat ini adalah kemoterapi kombinasi, tetapi responnya tidak bertahan lama dan tumor sering residif, karenanya diperlukan agen terapi baru yang efektif.

Pertumbuhan dan perkembangan sel kanker sangat bergantung pada siklus sel, proliferasi dan diferensiasi sel kanker, yang dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain cyclin D1, gen penekan tumor, apoptosis, serta metabolisme energi yang mendukung semua proses tersebut seperti AMPK, mTOR serta IGF 1R. Sel KKK, juga membutuhkan energi untuk metabolisme, sintesa protein dan proliferasi. Sebagian besar KKK menunjukkan mutasi pada alel yang tersisa dapat menonaktifkan TP53 sehingga menyebabkan fungsi untuk menekan tumor hilang. Kerusakan DNA (p53 yang berubah) pada sel urothelial dapat menyebabkan ketidakselarasan fase S dan M siklus sel, mengakibatkan apoptosis, demikian juga dengan *cyclin D1* yang sangat mempengaruhi siklus sel.

MiRNA berperan penting dalam diferensiasi, pematangan, dan metabolisme sel serta efek berbagai obat, juga terbukti berperan dalam sintesis lipid, metabolisme, transportasi dan penyimpanan. Mikro RNA miR-4257 pada *cell line* 5637 KKK berperan dalam tumorigenesis dan perkembangan tumor. Banyak target yang dimiliki miR-4257, salah satunya mRNA IGF 1R, sehingga dapat menekan proses translasi yang mengakibatkan penurunan protein IGF 1R yang ada.

Metformin ( $N^5, N^5$ -*dimethylbiguanide*) merupakan obat antidiabetes golongan *biguanide* dari agen hipoglikemik oral dan yang banyak digunakan untuk pengobatan *diabetes mellitus* tipe 2. Metformin dapat menghambat pertumbuhan berbagai sel kanker. Beberapa penelitian metformin sebagai antineoplastik, menunjukkan bahwa metformin secara langsung mempengaruhi proliferasi sel kanker, memicu peneliti untuk memanfaatkan metformin menjadi obat yang dapat digunakan untuk pengobatan kanker, disamping itu obat yang ada dan menjadi pilihan utama belum bisa memberikan hasil yang baik untuk penderita kanker kandung kemih.

Sebagian besar penelitian metformin menunjukkan bahwa metformin menekan pertumbuhan tumor dengan mengganggu metabolisme energi sel melalui jalur sumbu AMPK/mTOR. Metformin menyebabkan peningkatan AMP-activated protein kinase (AMPK) dan dapat merangsang apoptosis sel melalui p53. Metformin mengganggu siklus sel pada G0/G1 atau fase S berhenti sementara pada tingkatan sel, dengan menurunkan protein cyclin D1 pada sel kanker.

Metformin juga dapat menurunkan regulasi protein IGF 1R. Reseptor *insulin-like growth factor* (IGF 1R) yang mempunyai fungsi mempromosikan perkembangan dan progresivitas kanker dan berperan dalam mengintegrasikan sinyal nutrisi dan stres menjadi pergeseran energi dari proses anabolik (seperti



pertumbuhan dan reproduksi) menuju keadaan katabolik serta mempertahankan responsnya. Metformin juga menekan pematangan preadiposit manusia *in vitro* dan mengubah profil miRNA sel, termasuk miR-4257 yang salah satu target gen nya IGF 1R.

Penelitian ini penelitian *true experimental* dengan rancangan *completely randomized design* (rancangan acak lengkap) pada *cell line* 5637 yang merupakan sel karsinoma urothelial kandung kemih *grade II* yang diambil dari laki-laki kaukasian usia 68 tahun, yang diperoleh dari *American Type Culture Collection (ATCC® HTB-9TM)* Manassas Virginia dan dibiakkan di laboratorium Lembaga *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya.

Penanaman dan pembiakan *cell line* 5637 karsinoma urothelial kandung kemih dilakukan sesuai dengan protokol kit dan standar laboratorium, kemudian dilakukan penanaman menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok direplikasi sebanyak 6 *well* sehingga total sebanyak 30 *well*. Pembagian kelompok tersebut adalah kelompok kontrol 0 jam (K0), kelompok kontrol 24 jam (K24), kelompok kontrol 48 jam (K48), kelompok Metformin 15 mM 24 jam (P24) dan kelompok metformin 15 mM 48 jam (P48). Pemeriksaan variabel dilakukan sesuai dengan waktu yang ditentukan.

Hasil pembiakan *cell line* 5637 yang dilanjutkan dengan pemberian perlakuan pada sampel, diakhiri dengan penghitungan jumlah sel hidup dan jumlah sel secara keseluruhan sebelum akhirnya dilakukan pemeriksaan imunohistokimia dengan menggunakan antibodi AMPK, IGF 1R, p53 dan cyclin D1 serta RT-qPCR menggunakan primer miR-4257 dengan kontrol U6.

Data dikumpulkan dan diuji statistik menggunakan program SPSS 25, uji *Shapiro Wilk*, ANOVA, uji komparasi *Kruskal-Wallis* dan uji *Partial Least Square (PLS)*. Penghitungan tingkat ekspresi relatif dilakukan menggunakan metode *Comparative Ct* dengan menggunakan rumus R sesuai metode Livak.

Penelitian ini mendapatkan hasil analisis komparasi Ct metode *Livak* ekspresi relatif miR-4257 sebesar *fold change* 0,001, baik P24 dibanding K0, P48 dibanding K0, P24 dibanding K24 maupun P48 dibanding K48. Angka tersebut menunjukkan ekspresi pada kelompok terapi lebih rendah sebesar 0,001 dibandingkan kelompok kontrol (*down regulation*). Terapi metformin 15 mM pada 24 jam dan 48 jam diperoleh hasil terdapat perbedaan antara kelompok K0, K24, K48 dengan kelompok P24 jam dan P48 diperoleh nilai  $p < 0,05$ , akan tetapi tidak terdapat perbedaan antara kelompok P24 dan kelompok P48 mempunyai nilai  $p = 0,470$ . Nilai rerata Ct miR-4257 terdapat peningkatan pada kelompok P24 dan P48 dibandingkan dengan kelompok K0, K 24 dan K48.

Ekspresi protein AMPK pada berbagai kelompok K0, K24, K48, P24 dan P48, terdapat perbedaan yang signifikan dengan  $p < 0,05$ , akan tetapi nilai reratanya tidak meningkat. Uji beda antar kelompok hanya didapatkan perbedaan antara K48 dengan P48 dengan nilai  $p = 0,007$ , sedangkan uji beda antara kelompok yang lain tidak terdapat perbedaan, yang menunjukkan pemberian terapi metformin tidak dapat menaikkan ekspresi AMPK pada KKK.

Ekspresi protein IGF 1R pada kelompok K0, K24 dan K48 diperoleh skor 2 (100%), sedangkan kelompok P24 dan P48 diperoleh skor 1 (100%). Uji perbedaan antar kelompok diperoleh nilai  $p < 0,05$ , kecuali antara kelompok P24 jam dengan kelompok P48 diperoleh nilai  $p = 1,000$ . Hasil tersebut menunjukkan terapi metformin dapat menurunkan ekspresi protein IGF 1R.

Hasil uji statistik tidak didapatkan perbedaan ekspresi protein p53 *wild* pada berbagai kelompok dengan nilai  $p = 0,132$ , kecuali antara kelompok K48 (rerata 33,50) dibandingkan dengan kelompok P48 (rerata 12,92) yang didapatkan  $p = 0,036$ . Hasil tersebut menunjukkan terapi metformin tidak dapat meningkatkan ekspresi protein p53 *wild*.

Ekspresi protein *cyclin* D1, terdapat perbedaan pada berbagai kelompok K0, K24, K48, P24 dan P48. Hasil uji statistik ( $p$ ) antara kelompok P24 dengan P48 jam diperoleh nilai  $p = 0,020$  dan antara kelompok K48 dengan P48 mendapatkan hasil  $p = 0,011$ , menunjukkan terapi metformin 15 mM 48 jam dapat menurunkan ekspresi protein *cyclin* D1 pada *cell line* 5637 karsinoma urothelial kandung kemih.

Viabilitas pada berbagai kelompok *cell line* 5637 karsinoma urothelial kandung kemih, pada semua uji perbedaan antar kelompok mendapatkan nilai  $p < 0,05$  dengan nilai rerata semakin menurun. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa terapi metformin 15 mM dapat menurunkan viabilitas sel tumor baik pemberian 24 jam maupun 48 jam.

Hasil analisis mekanisme hubungan antara variabel menunjukkan bahwa terapi metformin 15 mM melibatkan mekanisme hubungan antara miR-4257, ekspresi protein IGF 1R, dan viabilitas pada karsinoma urothelial kandung kemih yang merupakan temuan baru pada penelitian ini. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian terdahulu yang lebih cenderung cara bekerjanya melalui aktivasi AMPK.

Kesimpulan penelitian ini dapat menjelaskan jalur mekanisme keterlibatan hubungan antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 *wild*, *cyclin* D1 dan viabilitas pada pemberian metformin pada karsinoma urothelial kandung kemih, serta membuktikan bahwa terapi metformin dapat menurunkan regulasi miR-4257, menurunkan ekspresi IGF 1R dan viabilitas karsinoma urothelial kandung kemih.

## ABSTRAK

### MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP SEL KARSINOMA UROTHELIAL KANDUNG KEMIH (CELL LINE 5637) MELALUI MIRNA-4257 DAN AMPK

**Latar belakang :** Karsinoma kandung kemih (KKK) adalah keganasan paling umum pada saluran kemih dan salah satu kanker penyebab kematian pada pria dewasa. Data dari *Global Cancer Statistic* (GLOBOCAN) 2018 menempatkan KKK di peringkat ke-10 kanker dengan angka kejadian terbesar di seluruh dunia. Terapi standar KKK responnya tidak bertahan lama dan sering residif, karenanya diperlukan agen terapi baru yang efektif. Pertumbuhan dan perkembangan sel kanker sangat bergantung pada siklus sel, proliferasi dan diferensiasi sel kanker, yang dipengaruhi antara lain oleh *cyclin D1*, gen penekan tumor, apoptosis, serta metabolisme energi yang mendukung semua proses seperti AMPK, dan IGF 1R. miRNA juga berperan penting dalam diferensiasi, pematangan, dan metabolisme sel serta efek berbagai obat. Mikro RNA miR-4257 pada *cell line 5637* KKK berperan dalam tumorigenesis dan perkembangan tumor. Banyak target yang dimiliki miR-4257, salah satunya mRNA IGF 1R, sehingga dapat menekan proses translasi yang mengakibatkan penurunan protein IGF 1R.

**Tujuan :** Menjelaskan jalur mekanisme terapi metformin terhadap KKK.

**Material dan metode :** Penelitian *true experimental* dengan rancangan *completely randomized design* pada *cell line 5637* yang merupakan sel karsinoma urothelial kandung kemih *grade II* yang diambil dari laki-laki kaukasian usia 68 tahun, yang diperoleh dari *American Type Culture Collection (ATCC® HTB-9TM)* Manassas Virginia dan dibiakkan di laboratorium Lembaga *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya. Penanaman dan pembiakan *cell line 5637* dilakukan sesuai dengan protokol kit dan standar laboratorium, kemudian dilakukan penanaman menjadi 5 kelompok dan tiap kelompok direplikasi 6 *well* sehingga total menjadi 30 *well* yaitu 3 kelompok kontrol dan 2 kelompok terapi metformin 15 mM (P24) dan (P48). Hasil pembiakan *cell line 5637* yang dilanjutkan dengan pemberian perlakuan, diakhiri dengan penghitungan viabilitas dan pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi AMPK, IGF 1R, p53 *wild* dan *cyclin D1* serta RT-qPCR dengan primer miR-4257. Data dikumpulkan dan diuji statistik menggunakan program SPSS 25, uji *Shapiro Wilk*, ANOVA, uji komparasi *Kruskal-Wallis* dan uji *Partial Least Square (PLS)*. Penghitungan tingkat ekspresi relatif dilakukan menggunakan metode *Comparative Ct* dengan menggunakan rumus R sesuai metode Livak.

**Hasil :** Terapi metformin 15 mM dapat menurunkan regulasi miR-4257, ekspresi protein IGF 1R, dan viabilitas sel tumor baik pemberian 24 jam maupun 48 jam. Terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam melibatkan mekanisme hubungan antara miR-4257, ekspresi protein AMPK, IGF 1R, p53 *wild*, *cyclin D1* dan viabilitas pada karsinoma urothelial kandung kemih.

**Kesimpulan:** terapi metformin dapat menurunkan regulasi miR-4257, menurunkan ekspresi IGF 1R dan viabilitas karsinoma urothelial kandung kemih.

**Kata Kunci:** Kanker Kandung kemih, miR-4257, AMPK, IGF 1R, p53 *wild*, *cyclin D1*, viabilitas

## ABSTRACT

### METFORMIN ANTICANCER MECHANISM IN BLADDER UROTHELIAL CARCINOMA CELLS (CELL LINE 5637) VIA MIRNA-4257 AND AMPK

**Background** Bladder cancer (BC) is the most common malignancy of the urinary tract and one of the leading causes of cancer death in adult men. Data from the 2018 Global Cancer Statistics (GLOBOCAN) placed BC as the 10th rank of cancer with the largest incidence rate worldwide. Response of standard therapy for BC was not long-lasting and recurrency often occurred, therefore, new effective therapeutic agent is needed. The growth and progression of cancer cells is highly dependent on the cell cycle, cancer cells proliferation and differentiation, which influenced by many factors such as cyclin D1, tumour suppressor gene, apoptosis, and also metabolic energy that promote all those processes like AMPK and IGF 1R. miRNAs also play an important role in the differentiation, maturation, and metabolism of cells as well as the effects of various drugs. The miR-4257 microRNA in BC cell line 5637 plays a role in tumorigenesis and tumour progression. MiR-4257 has many targets, one of them is IGF 1R mRNA, so that the translation process might be suppressed, which resulted in decreasing of IGF 1R protein.

**Objectives:** To explain the mechanism pathway of metformin therapy in BC.

**Material and Methods:** This research is true experimental study with a completely randomized design on cell line 5637 which is a grade II bladder urothelial carcinoma cell, taken from a 68-year-old Caucasian male, obtained from the American Type Culture Collection (ATCC® HTB-9TM) Manassas Virginia and cultured in the Laboratory of the Tropical Disease Centre Institute, Airlangga University, Surabaya. Planting and culturing of cell line 5637 was carried out according to the protocol kit and laboratory standards, then planting was carried out into 5 groups and each group was replicated 6 wells so that the total was 30 wells, namely 3 control groups and 2 groups of 15 mM metformin therapy (P24) and (P48). The results of cell line 5637 culture followed by giving treatment, ending with viability calculations and immunohistochemical examination using AMPK antibodies, IGF 1R, p53 wild and cyclin D1, also RT-qPCR with miR-4257 primers. Data were collected and statistically tested using the SPSS 25 program, the Shapiro Wilk test, ANOVA test, Kruskal-Wallis comparative test and Partial Least Square (PLS) test. The calculation of the relative expression level was carried out using the Comparative Ct method using the R formula according to the Livak method.

**Results:** Metformin 15 mM therapy could downregulate miR-4257, IGF 1R protein expression, and tumour cell viability in both 24 hours and 48-hours. Metformin 15 mM therapy (24-hours and 48-hours) is involved in association mechanism between miR-4257, AMPK protein expression, IGF 1R, wild p53, cyclin D1 and cell viability in bladder urothelial carcinoma.

**Conclusion:** Metformin therapy can downregulate miR-4257, decrease IGF 1R expression and bladder urothelial carcinoma viability.

**Keywords:** Bladder cancer, miR-4257, AMPK, IGF 1R, p53 wild, cyclin D1, viability