

DISERTASI

**MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP
VIABILITAS 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**

DISERTASI

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



**ANNY SETIJO RAHAJU
011617017336**

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

**MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP
VIABILITAS 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

Oleh :

**ANNY SETIJO RAHAJU
011617017336**

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

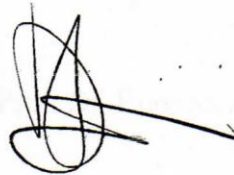
LEMBAR PENGESAHAN

DISERTASI

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

**TELAH DISETUJUI
PADA TANGGAL 30 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 Hendarto, 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

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga
Tentang Panitia Penguji Desertasi
Nomor : = 575/UN3.1.1/HK/2021
Tanggal : 27 Oktober 2021

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian ini dapat diselesaikan. Tidak lupa shalawat serta salam saya sampaikan kepada Baginda Nabi Muhammad Shalallahu ‘Alaihi Wassalam.

Dengan segala kerendahan hati, perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada yang terhormat :

Prof. Dr. Doddy M. Soebadi, dr., Sp.B., Sp.U(K), sebagai promotor, yang dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dukungan dan semangat, serta berkesempatan meluangkan waktu untuk membimbing demi perbaikan disertasi ini. Kepada beliau saya haturkan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Lukman Hakim, dr., MARS, PhD, Sp.U(K) sebagai ko-promotor 1 yang telah membimbing, memberi bantuan *cell line* dan memberi dorongan yang sangat bermanfaat bagi pelaksanaan penelitian disertasi. Kepada beliau saya haturkan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dr. Arifa Mustika, dr., M.Si sebagai ko-promotor 2, yang telah membimbing, memberi ide, teman berdiskusi dan memberi dorongan serta semangat yang sangat bermanfaat demi selesainya penelitian dan peningkatan mutu disertasi. Kepada beliau saya haturkan ucapan terima kasih yang tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya.

Dengan selesainya disertasi ini, perkenankanlah saya juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE., MT.Ak., CMA., selaku Rektor Universitas Airlangga, atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
2. Prof. Dr. Budi Santoso, dr., Sp.OG(K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga sekarang dan Prof. Dr. Soetojo, dr., Sp.U(K), Dekan Universitas Airlangga sebelumnya beserta seluruh jajarannya, atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
3. Prof. Dr. Hendy Hendarto, dr., Sp.OG(K), selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor sekarang dan Prof. Dr. Joewono, SpPD selaku Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran jenjang Doktor periode sebelumnya yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk menyelesaikan disertasi.
4. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, Drs., Msi; Prof. Soetjipto, dr., MS., Ph.D; Dr. Gondo Mastutik, drh., M.Kes.; Dr. H. Budi utomo, dr., M.Kes; Dr. Karyono Mintaroem, dr., SpPA sebagai Tim Penguji disertasi, yang telah memberikan kritik dan masukan terbaik demi kesempurnaan disertasi, sehingga disertasi ini bisa terselesaikan.
5. Pimpinan beserta Staf ITD Universitas Airlangga atas segala dukungan dan kerjasamanya selama pelaksanaan penelitian.
6. Prof. Dr. Nasronudin, dr., Sp.PD., K-PTI, FINASIM selaku direktur RSUD (RSKI), beserta staf atas segala dukungan dan kerjasamanya selama ini serta saat pelaksanaan penelitian.

7. Dr. Joni Wahyuhadi, dr., Sp.BS(K) selaku direktur Utama RSUD Dr. Soetomo, beserta Staf jajarannya atas segala dukungan dan kerjasamanya selama ini serta saat pelaksanaan penelitian.
8. Seluruh staf pengajar di Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya atas ilmu yang diberikan selama ini. Semoga Allah Subhanahu wata'ala mencatat sebagai amal ibadah. Kepada seluruh tenaga kependidikan atas segala bantuan selama menempuh pendidikan serta seluruh rekan Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Angkatan 2016 yang telah bersama menempuh pendidikan ini dan saling memberi semangat menyelesaikan pendidikan.
9. Dyah Fauziah dr., Sp.P.A.(K) selaku Ketua Departemen Patologi Anatomi sekarang dan Sjahjenny Moestokoweni dr., Sp.P.A.(K), MIAC, selaku Ketua Departemen Patologi Anatomi periode sebelumnya beserta Seluruh staf Pengajar dan tenaga kependidikan di Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, terima kasih atas doa dan segala bantuan selama menempuh pendidikan.
10. Etty Hary Kusumastuti, dr., Sp.P.A.(K), FIAC, selaku KSM Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo dan teman seperjuangan, serta semua tehnisi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo atas segala dukungan dan kerjasamanya selama pelaksanaan penelitian.
11. Kepada para guru saya sejak Pendidikan Taman Kanak-Kanak, Sekolah Dasar, Sekolah Menengah Pertama, Sekolah Menengah Atas, serta para Dosen di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan Program Studi Spesialis 1 Patologi Anatomik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., MS, Prof. Dr. Juliati H.A., dr., MS., Sp.P.A.(K), FIAC, Prof. J.H. Lunardhi, Sp.P.A.(K), FIAC, Prof. Dr., Endang Joewarini., dr., Sp.P.A.(K), Faroek Hoesin, dr., Sp.P.A.(K), Koesoemo Wardoyo, dr., MSc, Sp.P.A.(K), Troef Soemarno, dr., MS, Sp.P.A.(K), Tulus Panuwun, dr., MS, Sp.P.A.(K), saya sampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bimbingan dan didikannya selama saya menjadi anak didik. Semoga Allah SWT membalas dengan kebaikan berlipat ganda.
12. Kepada seluruh staf pengajar Departemen Patologi Anatomi, Dr.Imam Susilo,dr.,Sp.P.A.(K),FISCM, Dr. Willy Sandhika dr., M.Si., Sp.P.A.(K), Nila Kurniasari, dr., Sp.P.A.(K), Alphania Rahniayu, dr., Sp.P.A.(K), Heriyawati, dr., Sp.P.A.(K), Grace Ariani, dr., Sp.P.A.(K), Ridholia, dr., Sp.P.A.(K), terima kasih atas segala dukungan, doa dan bantuan dan kerjasamanya selama ini.
13. Kepada Priangga Adi W, dr., Sp.P.A., Khafidhotul Ilmiah, dr., Mbak Deya dari ITD, Mbak Nurul dari RSKI, Bu Lava, Mbak Mufi, Mbak Dyah, Mbak Manda, Mbak Nuri, Mbak Ika, Mbak Dita, Mbak Novi serta semua tehnisi Laboratorium Patologi Anatomi RSUD Dr. Soetomo Terima kasih atas segala dukungan dan kerjasamanya selama pelaksanaan penelitian. Semoga Allah SWT memberikan balasan kebaikan yang berlipat ganda kepada semuanya.
14. Kepada semua PPDS Prodi Spesialis Patologi Anatomi, khususnya dr Mimi dan dr. Pamela terima kasih atas bantuan dan dukungannya selama ini.
15. Kepada saudara-saudaraku tercinta Eka Marta Diana, M. Andri Kurniawan, A. Suratin Kurniawan, Anita Rachmayanti yang tetap selalu mendukung,

membantu dan memberikan semangat agar menyelesaikan pendidikan. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan keberkahan kepada kita semua.

Pada kesempatan ini, dari lubuk hati yang paling dalam saya sampaikan rasa hormat dan kasih sayang, serta terima kasih yang tak terhingga kepada:

16. Orang tua saya, Ibunda Hj. Siskah Binti Soemadji, ayahanda M. Misbach Allahuyarham yang telah mengasuh, mendidik, memberi nasehat yang baik dengan penuh kasih sayang, serta mendoakan yang terbaik sampai saat ini. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kasih sayang dan pahala yang berlipat ganda kepada beliau berdua, serta menempatkan di surga kelak.
17. Bapak mertua Sutrisni adji, Ibunda Mertua Srijatun Allahuyarhamah dan Ibunda Ana Munfarida. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kasih sayang dan pahala yang berlipat ganda kepada beliau semua.
18. Terima kasih yang setulus-tulusnya kepada suamiku tercinta Boedy Setya Santoso, dr., Sp.THT-KL(K)., FICS Allahuyarham yang selalu berjuang bersama dalam suka dan duka, memberikan restu, dukungan, doa, biaya, perhatian, kesabaran, kasih sayang yang luar biasa, serta meluangkan waktu untuk mendampingi dan berbagi tugas dalam mengasuh anak-anak sampai diakhir usia. Semoga Allah SWT memberikan tempat terbaik di surga Nya.
19. Anak-anakku Muftihana Hanin Nuha, M. Faris Ihsanuddin, M. Yusuf Ibrahim. Terima kasih atas pengertian dan keikhlasannya dalam memahami segala perjuangan yang Ibu lakukan selama ini. Semoga tetap semangat untuk mencari ilmu dan jangan pernah berhenti belajar. Semoga Allah SWT memudahkan kalian mencapai kesuksesan dunia akhirat.
20. Terima kasih saya sampaikan sedalam-dalamnya kepada semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu atas motivasi, dukungan, bantuan dan doa sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Saya menyadari bahwa hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, untuk itu saran dan kritik yang membangun demi perbaikan disertasi ini sangat saya harapkan dan hargai. Semoga disertasi ini dapat berkontribusi bagi perkembangan dan kemajuan teknologi di bidang ilmu kedokteran pada khususnya. Semoga Allah SWT tetap selalu melimpahkan segala nikmat-Nya kepada kita semua. Aamiin Yaa Robbal ‘Alamiin.

Penulis

Anny Setijo Rahaju

RINGKASAN

MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP VIABILITAS 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.

Mikro RNA 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 IR yang ada.

Metformin (N', N'-*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 IR. Reseptor *insulin-like growth factor* (IGF IR) 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 *wild* 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 sel karsinoma *urothelial* kandung kemih.

SUMMARY

ANTICANCER MECHANISM OF METFORMIN IN BLADDER UROTHELIAL CARCINOMA CELLS VIABILITY (CELL LINE 5637) VIA miRNA-4257 AND AMPK

Bladder carcinoma is the most common urinary tract malignancy and has mortality in adult male particularly. Bladder cancer rated as the 10th most common cancer in worldwide, according to Global Cancer Statistic (GLOBOCAN) 2018 data. Recent bladder carcinoma standard therapy is combination chemotherapy, but its response was not long-lasting and the tumour often recurrent, therefore, new effective therapeutic agent is needed.

Cancer cells growth and progression are very dependent to cell cycle, cancer cell 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, mTOR and IGF 1R. Bladder carcinoma cells also need energy for metabolism, protein synthesis, and proliferation. Almost all bladder carcinoma has mutation on left allele that inactivated TP53, so that, tumour suppressor function is lost as a consequence. Damaged DNA (altered p53) in *urothelial* cells may lead mismatch of phase S and M cell cycle, resulted in apoptosis, likewise cyclin D1 that considerably affects cell cycle.

MiRNA has critical role in differentiation, maturity, and cell metabolism, as well various drugs effect, also proven play a role in lipid synthesis, metabolism, transportation, and storage. The miR-4257 micro-RNA in bladder carcinoma cell line 5637 has a role in tumour tumorigenesis and 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.

Metformin (N', N'-dimethylbiguanide) is oral hypoglycemic agent and frequently used in type 2 diabetes mellitus therapy. Metformin may inhibit various cancer cells growth. Some studies about metformin as antineoplastic agent showed that metformin affect cancer cells proliferation directly. Metformin is widely available in pharmacies and inexpensive, so the researcher triggered to take advantage of metformin as a drug that may be used as cancer therapeutic agent, aside from first line choice of existed therapy which has not given a good result yet in bladder cancer patients.

The majority of metformin studies showed that metformin suppressed tumour growth by interfering cell metabolism energy through AMPK/mTOR axis pathway. Metformin upregulated AMP-activated protein kinase (AMPK) and induce cell apoptosis through p53. Metformin altered cell cycle in phase G0/G1 or phase S, that may temporarily stop the cell cycle, thus, reduced cyclin D1 protein in cancer cells.

Metformin might also downregulated IGF 1R protein. Insulin-like growth factor receptor (IGF 1R), which has function as promoting cancer progression and growth, also has a role in integrate nutrition signal and stress into an energy shift from anabolic process (such as growth and reproduction) towards catabolic state, and preserve its response. Metformin also suppressed human preadipocyte maturation in vitro and change cells miRNA profile, including miR-4257, which is one of IGF 1R gen target.

This research is true experimental study with completely randomized design approach in cell line 5637 which is a grade II bladder *urothelial* carcinoma cell that taken from Caucasian 68 years old male, obtained from American Type Culture Collection (ATCC® HTB-9TM) Manassas Virginia and cultured in the Laboratory of Tropical Disease Centre Institution Universitas Airlangga Surabaya.

Planting and culturing of bladder *urothelial* carcinoma cell line 5637 performed according to the kit protocol and laboratory standards, then planting was carried out into 5 groups and each group replicated for 6 wells, so that, the total amount is 30 wells. The distribution of those groups is 0-hour control group (K0), 24-hours control group (K24), 48-hours control group (K48), 24-hours metformin 15 mM group (P24), and 48-hours metformin 15 mM group (P48). Variable checks were carried out according to the specified time.

The results of cell line 5637 culture followed by giving treatment to the sample, ending with counting the numbers of live cells and the total number of cells, before finally carried out with immunohistochemical examination using AMPK antibodies, IGF 1R, p53, and cyclin D1, also RT-qPCR test using miR-4257 primers.

Data were collected and statistically tested using the SPSS 25 programme, Shapiro Wilk test, ANOVA test, Kruskal-Wallis 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.

This study obtained the results of comparative analysis of Ct using the Livak method, the relative expression of miR-4257 was fold change 0.001, both P24 compared to K0, P48 compared to K0, P24 compared to K24, and P48 compared to K48. These results showed that the expression in the therapy group is 0.001 lower than the control group (down regulation). Metformin 15 mM therapy at 24-hours and 48-hours showed that there was a difference between groups K0, K24, K48 with groups P24 and P48 with p value < 0.005, but there was no difference between group P24 and group P48 with p value = 0.470. The mean value of Ct miR-4257 showed an increase in the P24 and P48 groups compared to the K0, K24, and K48 groups.

AMPK protein expression in various groups K0, K24, K48, P24, and P48 shows a significant difference with p value < 0.05, but the mean value did not increase. The difference test between groups only found a difference between K48 and P48 with p value = 0.007, while the difference test between the other groups showed no difference, which indicated that the administration of metformin therapy could not increase AMPK expression in bladder carcinoma. IGF 1R protein expression in groups K0, K24, and K48 obtained score 2 (100%), while P24 and P48 groups obtained score 1 (100%). The difference test between groups obtained p value < 0.05, except between the P24 group and the P48 group that obtained p value = 1.000. These results indicate that metformin therapy can reduce IGF 1R protein expression.

The results of statistical tests did not show differences in the expression of wild p53 protein in various groups with p value = 0.0132, except between the K48 group (mean 33.50) compared to the P48 group (mean 12.92) which obtained p value = 0.036. These results showed that metformin therapy could not increase the expression of wild p53 protein.

The expression of cyclin D1 protein showed differences in various groups K0, K24, K48, P24, and P48. The results of the statistical tests (p) between groups P24 and P48 obtained p value = 0.020 and between groups K48 and P48 obtained p value

= 0.011, showing that metformin 15 mM therapy 48-hours can reduce cyclin D1 protein expression in cell line 5637 bladder *urothelial* carcinoma.

Viability in various groups of cell line 5637 bladder *urothelial* carcinoma, in all difference tests between groups obtained p value < 0.05, with decreasing mean value. The results of this study prove that metformin 15 mM therapy can reduce tumour cell viability in both 24-hours and 48-hours.

The analysis results of the association mechanism between variables showed that metformin 15 mM therapy involved association mechanism between miR-4257, IGF 1R protein expression, and viability in bladder *urothelial* carcinoma, which is a new finding in this study. The results of this study are different from previous studies which tend to work through AMPK activation.

The conclusion of this study explain the mechanism pathway involved in the association between miR-4257, AMPK expression, IGF 1R, p53 wild, cyclin D1, and viability cells in the administration of metformin in bladder *urothelial* carcinoma, as well as prove that metformin is able to downregulate miR-4257, decrease IGF 1R expression and bladder *urothelial* carcinoma cells viability.

ABSTRAK

MEKANISME ANTI KANKER METFORMIN TERHADAP VIABILITAS 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. Terapi standar KKK responnya tidak bertahan lama dan sering residif, karenanya diperlukan agen terapi baru yang efektif. Metformin sering digunakan dalam terapi *diabetes mellitus* tipe 2 dan dapat menghambat berbagai pertumbuhan sel kanker dengan mempengaruhi proliferasi sel kanker secara langsung.

Tujuan : Menjelaskan jalur mekanisme terapi metformin terhadap KKK.

Material dan metode : Penelitian *true* pada *cell line* 5637 yang merupakan sel karsinoma *urothelial* kandung kemih *grade* II yang dibiakkan di laboratorium Lembaga *Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Surabaya. Penanaman dan pembiakan sesuai protokol kit dan standar laboratorium, menjadi 5 kelompok sehingga total 30 *well* yaitu 3 kelompok kontrol dan 2 kelompok terapi metformin 15 mM (P24) dan (P48), dan semua kelompok direplikasi 6 *well*.

Pemeriksaan imunositokimia dengan antibodi AMPK, IGF 1R, p53 *wild* dan *cyclin* D1 serta RT-qPCR dengan primer miR-4257 yang dianalisa ekspresi relatif dengan metode Livak. Data diuji statistik sesuai tujuannya.

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 sel karsinoma *urothelial* kandung kemih serta menjelaskan mekanisme jalur terapi metformin pada karsinoma *urothelial* kandung kemih.

Kata Kunci: Kanker Kandung kemih, miR-4257, IGF 1R, viabilitas

ABSTRACT

ANTICANCER MECHANISM OF METFORMIN IN BLADDER UROTHELIAL CARCINOMA CELLS VIABILITY (CELL LINE 5637) VIA miRNA-4257 AND AMPK

Background: Bladder carcinoma (BC) is the most common urinary tract malignancy and has mortality in males. The standard therapeutic response for BC is short-lived and relapses frequently occur, therefore new, effective therapeutic agents are needed. Metformin is frequently used in type 2 diabetes mellitus therapy and may inhibit various cancer cells growth by affecting cancer cells proliferation directly. The objective was to explain the mechanism pathway of metformin therapy in BC.

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

Material dan Methods: A true experimental research was conducted on cell line 5637 of grade II bladder urothelial carcinoma in Tropical Disease Centre Institute, Universitas Airlangga, Surabaya. The culture of the cell line was carried out according to protocol kit and laboratory standards, then was divided into 5 groups that were 0-hour (K0), 24-hours (K24), and 48-hours (K48) as control groups, and 24-hours (P24), and 48-hours (P48) as metformin 15 mM groups. All groups were replicated in 6 wells. Expression of AMPK, IGF 1R, p53 wild, and cyclin D1 was evaluated by immunocytochemistry and relative expression of miR-4257 was performed by RT-qPCR and analyzed with Livak method. All data were analyzed by appropriate statistical methods according to the purpose.

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 is able to downregulate miR-4257, decrease IGF 1R expression and bladder urothelial carcinoma cells viability. This study explain the mechanism pathway of metformin in bladder urothelial carcinoma.

Keywords: Bladder cancer, miR-4257, IGF 1R, viability

PERNYATAAN ORSINILITAS

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini saya :

Nama : Anny Setijo Rahaju

NIM : 011617017336

Program Studi : S3 Kedokteran

Alamat / No. Telp : Bendul Merisi Utara 8/ 34 Surabaya/ 081803089442

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Disertasi saya ini adalah asli dan benar-benar hasil karya sendiri, dan bukan hasil karya orang lain dengan mengatas namakan saya, serta bukan merupakan hasil peniruan atau penjiplakan (plagiatism) dari hasil karya orang lain. Disertasi belum pernah diajukan untuk mendapatkan gelar akademik baik di Universitas Airlangga, maupun di Perguruan Tinggi lainnya;
2. Dalam Disertasi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain, kecuali secara tertulis dengan jelas dicantumkan sebagai acuan dengan disebutkan nama pengarang dan dicantumkan dalam daftar kepustakaan;
3. Pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pemyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar yang telah diperoleh. Karena karya tulis Disertasi ini, serta sanksi-sanksi lainnya sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Surabaya,

Yang membuat pernyataan,



Anny Setijo Rahaju

NIM. 011617017336

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xii
ABSTRAK	xv
ABSTRACT	xvi
PERNYATAAN ORSINILITAS	xvii
DAFTAR ISI.....	xviii
DAFTAR TABEL.....	xxiii
DAFTAR GAMBAR	xxiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxvi
DAFTAR SINGKATAN	xxvii
 BAB 1 PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan umum.....	6
1.3.2 Tujuan khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	7
1.4.1 Manfaat teoritik	7
1.4.2 Manfaat praktis	8
 BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	 9
2.1 Metformin.....	9
2.1.1 Farmakokinetik.....	9
2.1.2 Farmakodinamik.....	11
2.1.3 Metformin dan kanker	12
2.2 Karsinoma Kandung Kemih	17
2.2.1 Epidemiologi	18
2.2.2 Patogenesis	19
2.2.2.1 Perubahan dalam siklus sel	19
2.2.2.2 Dereglasi sinyal pertumbuhan sel	20
2.2.2.3 Perubahan dalam jalur kematian sel.....	22
2.2.3 Diagnosis dan terapi	24
2.3 Pemberian Metformin pada Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih	27
2.3.1 Mekanisme aksi metformin terhadap <i>cell line</i> 5637 karsinoma	
<i>urothelial</i> kandung kemih	29
2.3.2 Ekspresi AMPK pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	
dengan pemberian metformin.....	30

2.3.3 Ekspresi p53 <i>wild</i> pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan pemberian metformin.....	33
2.3.4 Ekspresi <i>cyclin D1</i> pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan pemberian metformin.....	36
2.3.5 Ekspresi protein IGF 1R pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan pemberian metformin.....	38
2.3.6 <i>Up regulation</i> miR-4257 pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan pemberian metformin.....	43
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL	48
3.1 Kerangka Konseptual	48
3.2 Hipotesis Penelitian	52
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	53
4.1 Rancangan Peneliatn.....	53
4.2 Materi Penelitian.....	54
4.2.1 Unit eksperimen.....	54
4.2.2 Replikasi dan jumlah sampel.....	54
4.3 Variabel Penelitian.....	55
4.3.1 Variabel bebas.	55
4.3.2 Variabel tergantung	55
4.3.3 Variabel antara.....	55
4.3.4 Variabel terkontrol	56
4.3.5 Definisi operasional variabel	56
4.4 Instrumen Penelitian	57
4.4.1 Kultur sel dan pemberian metformin	57
4.4.2 Pulasan imunositokimia.....	58
4.4.3 Isolasi dan purifikasi <i>small RNA</i>	59
4.4.4 <i>Real time PCR</i>	59
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	60
4.6 Prosedur Penelitian dan Pengumpulan Data.....	60
4.6.1 Pengaktifan sel karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih (<i>cell line</i> 5637)	60
4.6.2 Pembiakan sel karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih (<i>cell line</i> 5637)	61
4.6.3 Panen sel karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih (<i>cell line</i> 5637)	62
4.6.4 Randomisasi sampel <i>cell line</i> 5637	63
4.6.5 Isolasi dan purifikasi <i>small RNA</i>	63
4.6.6 <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> (RT-qPCR)	64
4.6.7 Pembuatan hapusan.....	66
4.6.8 Pemeriksaan imunositokimia menggunakan antibodi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild</i> dan <i>cyclin D1</i> pada sel karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih (<i>cell line</i> 5637).....	66
4.7 Analisis Data.....	67
4.7.1 Analisis deskriptif.....	67
4.7.2 Analisis inferensial	67
4.7.3 Analisis multivariat jalur	67

4.7.4 Analisis <i>comparative</i> Cq metode LIVAK	67
4.8 Kerangka Operasional Penelitian (Alur Penelitian).....	69
4.9 Risiko Penelitian	70
4.10 Etika Penelitian	70
BAB 5 HASIL PENELITIAN	71
5.1 Regulasi miR-4257 <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma	
<i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM.....	72
5.1.1 Hasil pemeriksaan RT-qPCR	73
5.1.2 Validasi pemeriksaan RT-qPCR U6	74
5.1.3 Validasi pemeriksaan RT-qPCR miRNA-4257	75
5.1.4 Ekspresi <i>endogenous/housekeeping gene</i> U6.....	75
5.1.5 Ekspresi miR-4257.....	76
5.1.6 Ekspresi relatif miR-4257	76
5.1.7 Perbedaan nilai Ct miR-4257 pada <i>cell line</i> 5637	
karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih antara kelompok	
yang mendapat terapi metformin 15 mM 24 jam	
dengan kontrol	77
5.2 Ekspresi AMPK <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung	
Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM	77
5.3 Ekspresi IGF 1R <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung	
Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM.....	81
5.4 Ekspresi p53 <i>wild Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung	
Kemih dengan Terapi Metformin 15 Mm.....	84
5.5 Ekspresi <i>cyclin</i> D1 <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung	
Kemih dengan Terapi Metformin 15 Mm	87
5.6 Viabilitas <i>cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih	
Dengan Terapi Metformin 15 mM	90
5.7 Hubungan antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild</i> ,	
<i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam dan	
48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	94
5.7.1 Analisis hubungan antar miR-4257, ekspresi AMPK,	
IGF 1R, p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi	
metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma	
<i>urothelial</i> kandung kemih	94
5.7.2 Analisis hubungan antar miR-4257, ekspresi AMPK, IGF	
1R, p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin	
15mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i>	
kandung kemih.....	99
5.7.3 Analisis hubungan antar miR-4257, ekspresi AMPK, IGF	
1R, p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin	
15 mM 24 jam dan 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma	
<i>urothelial</i> kandung kemih	104
5.8 Analisis Jalur antara miR-4257, Ekspresi AMPK, IGF 1R, p53	
<i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan Viabilitas pada Terapi Metformin 15 mM pada	
<i>Cell Line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih.....	109
5.8.1 Analisis Jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R,	
p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin	

15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	109
5.8.2 Analisis jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	110
5.8.3 Analisis jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	111
BAB 6 PEMBAHASAN.....	112
6.1 Regulasi miR-4257 <i>Cell Line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM.....	112
6.1.1 Ekspresi relatif miR-4257 <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan terapi metformin 15 mM..	113
6.1.2 Ekspresi miR-4257 ada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	113
6.2 Ekspresi AMPK <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM	115
6.3 Ekspresi IGF 1R <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM	117
6.4 Ekspresi p53 <i>wild Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM.	119
6.5 Ekspresi <i>cyclin</i> D1 <i>Cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM	122
6.6 Viabilitas <i>cell line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih dengan Terapi Metformin 15 mM	124
6.7 Mekanisme hubungan antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>Wild, cyclin</i> D1 dan Viabilitas pada Terapi Metformin 15 mM pada <i>Cell Line</i> 5637 Karsinoma <i>Urothelial</i> Kandung Kemih.....	127
6.7.1 Hubungan antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF1R, p53 <i>Wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	127
6.7.2 Hubungan antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF1R, p53 <i>Wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> Kandung kemih.....	128
6.7.3 Hubungan antara mir-4257, ekspresi AMPK, IGF1R, p53 <i>Wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	130
6.8 Analisis Jalur Antar Variabel	132
6.8.1 Analisis jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild, cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	132

6.8.2 Analisis jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	134
6.8.3 Analisis Jalur antara miR-4257, ekspresi AMPK, IGF 1R, p53 <i>wild</i> , <i>cyclin</i> D1 dan viabilitas pada terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	135
6.9 Temuan Baru.....	137
6.10 Keterbatasan Penelitian	137
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN.....	138
7.1 Kesimpulan.....	138
7.2 Saran	139
DAFTAR PUSTAKA	140
LAMPIRAN.....	149

DAFTAR TABEL

Tabel 4.1	Definisi operasional.....	56
Tabel 4.2	Kondisi PCR.....	65
Tabel 5.1	Distribusi nilai Ct U6.....	75
Tabel 5.2	Distribusi nilai Ct miR-4257.....	76
Tabel 5.3	Analisis ekspresi relatif miR-4257 pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	77
Tabel 5.4	Nilai p Ct miRNA-4257 pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	78
Tabel 5.5	Rerata ekspresi protein AMPK pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	80
Tabel 5.6	Nilai p ekspresi AMPK pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	81
Tabel 5.7	Ekspresi IGF1R pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	82
Tabel 5.8	Nilai p ekspresi IGF 1R pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	82
Tabel 5.9	Ekspresi p53 <i>wild</i> pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	84
Tabel 5.10	Nilai p ekspresi p53 <i>wild</i> <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	86
Tabel 5.11	Ekspresi <i>cyclin</i> D1 pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	87
Tabel 5.12	Nilai p Ekspresi <i>cyclin</i> D1 pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.	88
Tabel 5.13	Distribusi viabilitas <i>Cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	92
Tabel 5.14	Rerata nilai Ct miR-4257 pada dosis metformin 15 mM pada 24 jam dan kontrol.....	86
Tabel 5.15	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil tidak signifikan.	94
Tabel 5.16	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil signifikan	95
Tabel 5.17	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil tidak signifikan.	99
Tabel 5.18	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil signifikan	100
Tabel 5.19	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil tidak signifikan.....	104
Tabel 5.20	Data hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan hasil signifikan.....	105

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mekanisme potensial aksi metformin pada metabolisme Dan proliferasi sel.....	16
Gambar 2.2	Penentuan stadium karsinoma <i>urothelial</i> kandung Kemih.....	26
Gambar 2.3	<i>MicroRNAs</i> (miRNA) dan cara kerjanya dalam mengatur fungsi gen.....	45
Gambar 3.1	Kerangka konseptual.....	49
Gambar 4.1.	Rancangan penelitian	53
Gambar 4.2.	Alur Penelitian	69
Gambar 5.1	Grafik pada RT-qPCR U6.....	74
Gambar 5.2	Grafik pada RT-qPCR miR-4257.....	75
Gambar 5.3	Ekspresi AMPK pada inti dan sitoplasma <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	80
Gambar 5.4	Ekspresi IGF 1R pada membran sel dan sitoplasma <i>cell</i> <i>line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih.....	83
Gambar 5.5	Ekspresi p53 <i>wild</i> pada inti <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	85
Gambar 5.6	Ekspresi <i>cyclin</i> D1 pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih	89
Gambar 5.7	Pertumbuhan <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih pada K0.....	90
Gambar 5.8	Pertumbuhan <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih pada K24.....	90
Gambar 5.9	Pertumbuhan <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih pada K48.....	91
Gambar 5.10	Pertumbuhan <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih pada Metformin 15 mM 24 jam P24.....	91
Gambar 5.11	Pertumbuhan <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih pada Metformin 15 mM 48 jam.....	92
Gambar 5.12	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai O dan r^2	97
Gambar 5.13	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai T	98
Gambar 5.14	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai O dan r^2	102
Gambar 5.15	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai T	103
Gambar 5.16	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada <i>cell line</i> 5637 karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai O dan r^2 ...	107
Gambar 5.17	Gambar mekanisme hubungan antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada <i>cell line</i> 5637	

	karsinoma <i>urothelial</i> kandung kemih dengan nilai T	108
Gambar 6.1	Analisis jalur antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam pada KKK.....	132
Gambar 6.2	Analisis jalur antar variabel terapi metformin 15 mM 48 jam pada KKK.....	133
Gambar 6.3	Analisis jalur antar variabel terapi metformin 15 mM 24 jam dan 48 jam pada KKK.....	135

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Dokumen kelaikan etik.....	148
Lampiran 2	Gambar <i>well</i>	149
Lampiran 3	<i>Data sheet cell line</i> 5637.....	150
Lampiran 4	Metode Pulasan Imunohistokimia	153
Lampiran 5	<i>Data sheet</i> AMPK.....	155
Lampiran 6	<i>Data sheet</i> IGF 1R	157
Lampiran 7	<i>Data sheet cyclin</i> D1	159
Lampiran 8	<i>Data sheet</i> p53	161
Lampiran 9.	<i>Data sheet</i> purifikasi miRNA	163
Lampiran 10	<i>Data sheet Master Mix</i>	179
Lampiran 11	<i>Data sheet Primer</i> MiR-4257	180
Lampiran 12	<i>Data sheet Primer</i> U6	181
Lampiran 13	Publikasi Artikel: CYCLIN D1, p53, AND Ki-67, THEIR ROLES IN UROTHELIAL CARCINOMA OF BLADDER IN DR. SOETOMO GENERAL ACADEMIC HOSPITAL, SURABAYA, INDONESIA DURING 2010-2019.....	182
Lampiran 14	Publikasi artikel : Correlation Between VEGF and EGFR Expression in Urothelial Carcinoma of Bladder.....	188
Lampiran 15	Hasil statistik	194
Lampiran 16	Perhitungan Ekspresi Relatif miR-4257	239

DAFTAR SINGKATAN

ACC	: <i>Acetyl Coa Carboxylase</i>
ACSS2	: <i>Acetyl-CoA synthetase 2</i>
ADAM	: <i>Allosteric drug and metabolite</i>
ADP	: <i>5' Adenosine Diphosphate</i>
AICAR	: <i>5-Aminoimidazole-4-Carboxamide Ribonucleotide</i>
AMP	: <i>5' Adenosine Monophosphate</i>
AMPK	: <i>5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase</i>
ATG	: <i>Autophagy-related gene</i>
ATM	: <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	: <i>adenosine triphosphate</i>
CCND	: <i>cyclin D</i>
CDK	: <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CIS	: <i>Carcinoma In Situ</i>
CLr	: <i>Clearens Time</i>
CT	: <i>Computer Tomography</i>
(DEG)	: <i>Differensial Expression Gen</i>
DGCR8	: <i>DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8</i>
DMT2	: <i>Diabetes Mellitus Tipe 2</i>
DNA	: <i>Deoxiribo Nucleic Acid</i>
DRAM	: <i>Damage-Regulated Autophagy Modulator</i>
ECM	: <i>Ekstraceluler matrix</i>
EGF	: <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	: <i>Epidermal Growth Factor Reseptor</i>
ERK	: <i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i>
FADD	: <i>Fas-Associated Death Domain</i>
FGFR3	: <i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
FGF	: <i>Fibroblast growth factors</i>
FSH	: <i>Follicle-stimulating hormone</i>
GH	: <i>Growth Hormon</i>
GLUT4	: <i>glucose transporter type 4</i>
Her2	: <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
HFD	: <i>High Fat Diet</i>
IGF 1	: <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>
IGF 1R	: <i>Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IGFBP	: <i>IGF Binding Protein</i>
IHK	: <i>Imunohistokimia</i>
G0/G1	: <i>Gap 0/ Gap 1</i>
GLUT1 /4	: <i>Glucose Transport</i>
H2 blocker	: <i>Histamin 2 Blocker</i>
HIF1A	: <i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
HMG-CoA	: <i>3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA</i>
hsa	: <i>Homo saphien</i>
hsp70	: <i>Heat Shock Protein 70</i>
JNK	: <i>c-Jun N-Terminal Kinase</i>
KKK	: <i>Kanker Kandung Kemih</i>
KKKNIO	: <i>Karsinoma Kandung Kemih Non Invasif Otot</i>

LFD	: <i>Low Fat Diet</i>
LKB1	: <i>Kinase Liver Kinase B1</i>
MAPK	: <i>Mitogenik -Activated- Protein Kinase</i>
MCM-2	: <i>Mini Chromosome Maintenance</i>
MDM2	: <i>Mouse double minute 2 homolog</i>
MDMX	: <i>Mouse double minute X</i>
MIBC	: <i>Muscle Invasive Bladder Cancer</i>
miRISC	: <i>Micro RNA-Induced Silencing Complex</i>
MiRNA	: <i>Micro Ribo Nucleic Acid</i>
MMPs	: <i>Matrix MetalloProteinases</i>
mRNA	: <i>Messenger Ribo Nucleic Acid</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
mTOR	: <i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NMIBC	: <i>Non-Muscle Invasive Bladder Cancer</i>
NSCLC	: <i>Non Small Cell Lung Cancer</i>
OCT	: <i>Organic Kation Transporter</i>
PCNA	: <i>Proliferation Cell Nuclear antigen</i>
PCOS	: <i>Polycystic Ovarium Syndrome</i>
PCR	: <i>Poly Chains Reaction</i>
PDGF	: <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGC-1a	: <i>peroxisome proliferator-activated receptor-g coactivator 1a</i>
PI3K	: <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PMAT	: <i>Plasma Membrane Monoamine Transporter</i>
PSA	: <i>Prostate Spesifik Antigen</i>
p53	: <i>protein 53</i>
Rb1	: <i>Retinoblastoma 1</i>
RCC	: <i>Renal Cell Carcinoma</i>
RFS	: <i>recurrence-free survival</i>
RISC	: <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
S	: <i>Sintesis</i>
SCO2	: <i>Sintesis Cytochrome C Oxidase 2</i>
STK11	: <i>Serine Treonine Kinase 11</i>
TIGAR	: <i>TP53-Induced Glycolysis And Apoptosis Regulator</i>
T1G3	: <i>high-grade T1</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	: <i>Tumor Necrosis Factor reseptor</i>
TNM	: <i>Tumor-Nodal-Metastasis</i>
TP53	: <i>Tumor Protein 53</i>
TP63	: <i>Tumor Protein 63</i>
TSC-2	: <i>Tuberous Sclerosis 2 Protein</i>
TSP-1	: <i>Trombospondin-1</i>
UBC	: <i>Urothelial Bladder Cancer</i>
UTR	: <i>Untranslated Region</i>
VEGF	: <i>Vascular Endothel Growth Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organisation</i>
WT1	: <i>Wilm's Tumor 1</i>