

# Peningkatan Kematian Sel Kanker Hepatoseluler dengan Biomarker Penurunan Ekspresi Gen miRNA (Mikro RNA) 146 A yang Diberikan Asam Klorogenat Kopi Robusta Lampung

Sukohar A<sup>1</sup>, Herawati H<sup>2</sup>, Witarto AB<sup>3</sup>, Setiawan,<sup>3</sup>  
Wirakusumah FF,<sup>4</sup> Sastramihardja HS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

<sup>2</sup> Bagian Penelitian dan Pengembangan Biologi Molekuler RS Kanker Dharmais

<sup>3</sup> Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

<sup>4</sup> Bagian Obstetri dan Ginekologi Pascasarjana Universitas Padjadjaran

<sup>5</sup> Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

## Abstrak

Pemanfaatan obat herbal untuk mengatasi penyakit kanker memerlukan terobosan konkrit. Artinya, dibutuhkan pengembangan obat herbal yang mengacu kepada standar uji mutu, khasiat dan keamanan. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis terhadap mekanisme kerja obat herbal pada tingkat molekuler. Asam klorogenat (AK) merupakan sebagai senyawa aktif yang dapat diisolasi dari tanaman obat tradisional yang dijadikan terapi kemopreventif Kanker Hepatoseluler (KHS), diduga bekerja sebagai antioksidan eksogen dan berperan mencegah kerusakan sel serta dapat menghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan radikal bebas. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *Cell Lines Hep-G2* seri 1886 yang didapat melalui *Riken Cell Bank-Tohoku University*, Jepang. Tujuan penelitian ini untuk memahami mekanisme kerja AK dalam menghambat pertumbuhan KHS dengan model *cell lines Hep-G2* seri 1886 melalui ekspresi gen *miRNA 146A*. Penelitian ini deskriptif-analitik dan eksperimental murni dilakukan pada 72 kelompok sampel. Satu kelompok sel terdiri dari 250 ribu sel kanker. Sampel dibagi dalam 4 kelompok besar, yaitu 0, 8, 18 dan 24 jam. Penelitian menggunakan 3 dosis AK: 727, 500 dan 250  $\mu\text{M}$ , dilakukan 3 kali pengulangan pemeriksaan, kemudian dibandingkan antara sebelum dan sesudah paparan. Peran ke-3 dosis AK terhadap *Hep-G2* dianalisis dengan membandingkan ekspresi *miRNA 146A* antara sebelum dan sesudah paparan pada 0, 8, 18, dan 24 jam. Data diuji secara statistik dengan uji beda, *t*, *repeated measurement*, *pearson* dan uji regresi linier berganda. Hasil penelitian: Terjadi penurunan ekspresi *miRNA 146A*, terendah pada kelompok 24 jam setelah paparan AK pada dosis 727  $\mu\text{M}$  (0,85), diikuti 500  $\mu\text{M}$  (1,28) dan ekspresi tertinggi pada dosis 250  $\mu\text{M}$  (1,61), dilanjutkan dengan uji statistik pada jam ke-8 dan jam ke-18 nilai *Cq miRNA146A* berbeda bermakna  $p < 0,05$  pada semua dosis AK (727, 500 dan 250  $\mu\text{M}$ ). Simpulan penelitian adalah AK sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi *miRNA 146A*. [JUKU Unila 2013;3(2):1-8]

**Katakunci:** asam klorogenat, kanker hepatoseluler, *miRNA146A*

## Pendahuluan

Diperlukan suatu usaha yang terpadu dan berkelanjutan untuk menemukan berbagai senyawa antikanker baru yang mempunyai aktifitas yang efektif dan selektif serta aman bagi jaringan sehat. Salah satu pendekatan yang bisa dilakukan adalah dengan menggunakan senyawa antikanker alami yang diisolasi dari tumbuhan, hewan dan juga berbagai mikroorganisme.

Telah diidentifikasi lebih 40.000 tumbuhan di dunia dan 30.000 tumbuhan

yang dikenal di Indonesia. Namun, hanya sekitar 940 jenis di antaranya merupakan tumbuhan yang memiliki khasiat dan dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional (Masyhud, 2010).

Pemanfaatan obat herbal untuk mengatasi penyakit kanker memerlukan terobosan konkrit, maka memerlukan pengembangan obat herbal yang mengacu pada standar uji mutu, khasiat dan keamanan. Dalam pengembangan obat herbal perlu dilakukan analisis tentang mekanisme kerja obat herbal pada tingkat molekuler.

Penelitian ini adalah penelitian biologi molekuler dengan menggunakan senyawa aktif Asam Klorogenat yang kemampuan tinggi dalam menghambat pertumbuhan sel KHS (Kanker Hepatoseluler) dengan model *Cell Lines Hep-G2* (Nita, 2002, Wang, 2010, Sukohar dkk., 2012). *Mikro RNA (miRNA)* diharapkan dapat digunakan sebagai diagnosis, prognosis dan monitoring terapi KHS.

Peran Asam Klorogenat dalam menghambat pertumbuhan *Cell Line Hep-G2* menggunakan jalur gen *miRNA 146 A* sebagai penanda dan ditunjukkan dengan penurunan aktifitas gen *miRNA 146 A* merujuk pada penelitian yang telah dilakukan oleh Chen *et al.* (2010).

*Mikro RNA* adalah suatu asam ribonukleotida baru yang bersifat *non-protein-coding*, berukuran sangat kecil 19-25 pasang basa, berperan dalam menghambat ekspresi gen. *MiRNA* baru berkembang sekitar tahun 2000 dan pertama kali ditemukan oleh Victor Ambros (Ambros, 2004)

Pada mamalia, *miRNA* pertama-tama tercantum sebagai transkrip RNA yang panjang (antara ratusan nukleotida dan puluhan kilobasa), disebut primer *mikroRNA (pri-miRNA)*, yang berisi dasar-pasangan sempurna seperti struktur jepit rambut. *Pri-miRNA*, yang mungkin berisi *miRNA* dengan urutan pengkodean ganda, yang dibelah dalam inti menjadi lebih pendek menjadi prekursor *miRNA (pre-Mirna)*. Reaksi ini dilakukan oleh protein kompleks yang disebut mikroprosesor, yang melibatkan *Drosha*, yang mengandung enzim *RNase III*. *Pre-miRNA* adalah *loop* batang pendek dengan ukuran ~70 nukleotida, pada 2-nukleotida yang dikaitkan pada posisi 3'. Ini adalah *pre-RNA* yang diekspor dari nukleus oleh *Exportin-5*, dan membelah di sitoplasma dengan bantuan enzim *RNase III*, sehingga menghasilkan 19-25 nukleotida matang *miRNA* ganda. Untai *miRNA* dengan pasangan yang tidak stabil (untai pemandu)

terbagi menjadi *RNA induced silence complex (RISC)* yang terdiri dari *TAR RNA Binding Protein (TRBP)* dan protein Ago2 (*Argonaute*) (Chendrimada, 2005)

Target gen NF-KB adalah *miRNA 146 A* dan *miRNA 146 A* diaktivasi oleh NF-KB, apabila aktifitas NF-KB meningkat maka *miRNA 146 A* juga akan meningkat. *MiRNA 146 A* menghambat regulasi (*down regulation*) terhadap IRF5 (*Interferon Regulatory Factor-5*), STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription-1*), dan menghambat regulasi (*up regulation*) IRAK-1, (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1*), IRAK-2 (*Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 2*) dan TRAF-6 (*TNF Receptor Associated Factor*). Target gen TRAF 6 adalah (*TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2*) TAB 1/2 dan (*Triticum aestivum kinase*) TAK 1. Target gen TAB 1/2 dan TAK 1 adalah menghambat gen (*inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells/ kinase epsilon*) IKKe. Target gen IKKe adalah menghambat (*inhibitor kappa beta*) IKb (Schott & Stoecklin, 2010).

Kanker hati primer (hepatoma) yang berasal dari sel hati merupakan kanker nomor lima tersering di Indonesia. Penyebab pasti belum diketahui tetapi penyakit ini paling banyak ditemukan pada kelompok penduduk yang berisiko tinggi untuk mendapatkan kanker hati ini yaitu pada penderita sirsiosis hati (pengerasan hati), hepatitis virus B aktif, hepatitis virus B *carrier*, dan pada penderita hepatitis virus C. Model kanker hepatoseluler (KHS) yang akan digunakan untuk penelitian ini adalah secara *in vitro* dengan menggunakan *Cell Lines Hep-G2* yang diperoleh dari *Riken Cell Bank-Tohoku University-Japan*.

Permasalahan yang dihadapi pasien KHS; penyakit yang memerlukan terapi cukup lama dan penyembuhan yang tidak memuaskan, memerlukan obat-obatan yang sangat mahal dan efek samping yang berat.

Dengan penelitian ini, ke depan diharapkan dilakukan penelitian pada hewan uji dan dilanjutkan pada tahap uji klinis asam klorogenat sehingga menjadi suatu produk fitofarmaka, di produksi secara masal oleh industri. Selain itu diharapkan *miRNA 146 A* dapat dijadikan sebagai deteksi dini terhadap kanker hepatoseluler.

## Metode

Metode penelitian ini adalah deskriptif dan eksperimental murni. Bahan uji menggunakan asam klorogenat yang diisolasi dari kopi robusta Lampung tanpa melalui pemanasan dan *Cell Lines (Hep-G2 1886)* didapat dari *Riken Cell Bank-Tohoku University-Japan*, dan dikultur di Laboratorium Biologi Molekuler RS Kanker Dharmais dengan kriteria inklusi: *Cell Lines Hep-G2* didapat dari induk yang sama, yang dapat tumbuh pada media kultur sehingga mencapai *confluent* 60-80%, berasal dari *passage* ke-3. Sampel dikelompokkan dalam 4 kelompok besar (0, 8, 18, dan 24 jam), tiap kelompok terdiri dari 18 sumuran dan tiap sumuran berisi 250 ribu sel *Hep-G2*. Sampel diberi AK dosis 727, 500 dan 250  $\mu$ M, dibandingkan antara sebelum dan sesudah pemaparan AK dan masing-masing kelompok dilakukan pengulangan 3 kali. Total sampel adalah 72 kelompok *Cell Line Hep-G2*, kemudian diintervensi AK dan diperiksa dengan RT-PCR

Optimasi untuk kandidat *refrence genemiRNA 146 A*, dilakukan dengan bantuan mesin RT-PCR CFX96, menggunakan 4 kandidat *refrence gene*, yaitu *mir (mikro RNA)-16*, *mir-21*, *mir-103* dan *mir-423-3p*. Masing-masing *mir* diwakili oleh 8 sampel (4 sampel sebelum intervensi dan 4 sampel setelah intervensi) dan total sampel dalam 2 kali pemeriksaan (*running reference gene* berjumlah 104 sampel termasuk 4 NTC (*non templete controle*) dan 4 buah *spike*. Hasil pemeriksaan RT-PCR untuk mencari kandidat *reference gene* dianalisis dengan menggunakan *software*

*Bio-Rad CFX Manager 2.1* (Hercules, California) dan *Normfinder* (Andersen *et al.*, 2004).

Setelah kandidat *reference gene* dan suhu optimim didapat, dilanjutkan dengan memaparkan 3 dosis AK pada tiap sumuran sesuai dengan waktu yang telah ditentukan (0, 8, 18 dan 24 jam), dilakukan isolasi RNA, dibuat cDNA dan dilakukan pemeriksaan dengan mesin RT-PCR CFX-96. Hasil pemeriksaan berupa angka dan grafik, dianalisis menggunakan *software* SPSS 17.

Data dianalisis dengan *repeated measurement*, setelah normalisasi data dengan *kolmogorov-smirnov* dan data berdistribusi normal. Jika data tidak berdistribusi normal, dilakukan transformasi data. Bila pada uji *repeated measurement* didapatkan perbedaan bermakna maka untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna maka harus dilakukan

Analisis *pairwisse comparisons*. Uji *pairwise comparisons* ini, dilakukan perbandingan untuk masing-masing waktu, yaitu jam ke-0, ke-8, ke-18, dan ke-24, sehingga dapat diketahui perbedaan waktu ekspresi gen yang bermakna.

Untuk menilai peran asam klorogenat terhadap penghambatan pertumbuhan *cell lines Hep-G2*, dilakukan uji *multivariat regresi linier* terhadap masing-masing variabel terikat sehingga didapatkan nilai dosis dengan daya hambat tertinggi dan dilambangkan oleh koefisien korelasi  $R^2$ .

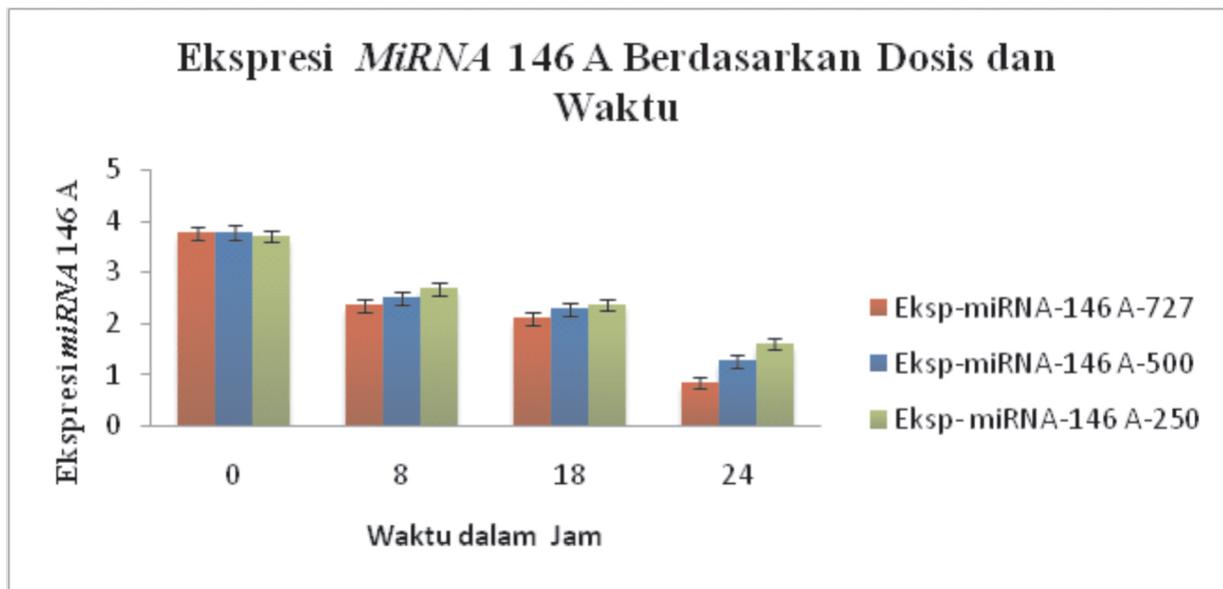
## Hasil

Uji MTT adalah uji sitotoksisitas untuk menilai efek senyawa aktif asam klorogenat terhadap *Hep-G2*. Optimasi pada uji ini, dilakukan dengan berbagai variasi waktu dan dosis untuk mendapatkan konsentrasi dan waktu yang optimal. Uji MTT dilakukan dimulai dengan 6, 24, 48, 72 dan 96 jam setelah perlakuan. Berdasarkan penelitian pendahuluan ini, asam klorogenat yang dapat menghambat pertumbuhan *Hep-G2* 50% pada 24 jam setelah pemberian asam klorogenat.

Selanjutnya dilakukan penentuan nilai  $IC_{50}$  asam klorogenat dan diperoleh pada konsentrasi 727  $\mu M$ . Peneliti menambahkan variasi dosis asam klorogenat yaitu 500 dan 250  $\mu M$  untuk menganalisis variasi dosis terhadap ekspresi gen miRNA 146 A dan sebagai syarat uji toksisitas.

Analisis ekspresi gen miRNA 146 A menggunakan metode Livak dengan rumus:

$2^{-\Delta\Delta Cq}$ . Normalisasi dilakukan dengan mengurangkan masing-masing nilai  $Cq$  target sebelum dan sesudah pemaparan (berdasarkan 4 perbedaan waktu) dengan masing-masing nilai  $Cq$  reference (berdasarkan 4 perbedaan waktu), sehingga didapat nilai  $\Delta Cq$ . Nilai  $\Delta\Delta Cq$ , ditentukan dengan mengurangkan nilai  $\Delta Cq$  target terhadap  $\Delta Cq$  reference.



Gambar 1 Ekspresi *MiRNA 146 A* berdasarkan dosis asam klorogenat 727, 500, 250  $\mu M$  terhadap waktu 0, 8, 18 dan 24 Jam

Gambar 1, ekspresi *miRNA 146 A* menurun dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Ekspresi *miRNA 146 A* terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan asam

klorogenat adalah pada dosis 727  $\mu M$  (0,85), kemudian ekspresi meningkat pada dosis 500  $\mu M$  (1,28) dan ekspresi tertinggi pada dosis 250  $\mu M$  (1,61).

Tabel 1 Uji F *Repeated Anova MiRNA146 A*

Sumber Variasi	Statistik	F	P
Faktor <i>miRNA 146 A</i>	<i>Greenhouse-Geiser</i>	4,519	0,29
Peran AK Terhadap Perbedaan Waktu <i>miRNA 146 A</i>	<i>Sphrecity Assumed</i>	4,519	0,012

Berdasarkan uji F *Repeated Anova* nilai  $p < 0,05$  pada *miRNA146 A* maka asam klorogenat berbeda bermakna terhadap

perbedaan waktu nilai  $Cq$  *miRNA146 A* antara sebelum dan sesudah pemaparan.

**Tabel 2** Signifikansi *MiRNA 146 A* terhadap perbedaan antarwaktu

Perbandingan	<i>miRNA 146 A-727</i>	<i>miRNA 146 A-500</i>	<i>miRNA 146 A-250</i>
	P	P	P
0 Jam vs 8 Jam	TB	TB	0.032
0 Jam vs 18 Jam	TB	TB	TB
0 Jam vs 24 Jam	TB	TB	TB
8 Jam vs 18 Jam	TB	TB	TB
8 Jam vs 24 Jam	TB	TB	0.026
18 Jam vs 24 jam	TB	TB	0.006

Keterangan: Nilai p dihitung berdasarkan uji *pairwise comparison*  
Bermakna bila  $p < 0,05$ . TB: tidak bermakna

Tabel 2, menyajikan data nilai Cq *miRNA 146 A* (250  $\mu$ M) jam ke-0 berbeda bermakna dengan nilai Cq jam ke-8 dengan  $p=0,032$  dan  $p < 0,05$ . Nilai Cq *miRNA* (250  $\mu$ M) jam ke-8 berbeda bermakna dengan nilai Cq jam ke-24 dengan nilai  $p=0,026$  dan  $p < 0,05$ . Nilai Cq *miRNA* (250  $\mu$ M) jam ke-18 berbeda bermakna dengan nilai Cq jam ke-24 dengan nilai  $p=0,006$  dan  $p < 0,05$ .

Tabel 3, menyajikan data waktu pemaparan AK terhadap *miRNA146 A*, berbeda bermakna pada jam ke-8 dan jam ke-18 pada dosis asam klorogenat 727, 500 dan 250  $\mu$ M dengan nilai  $p < 0,05$ .

**Tabel 3** Signifikansi antara *MiRNA 146 A* terhadap perbedaan dosis AK dan waktu

Perbandingan	<i>miRNA 146 A</i>
	P
0 Jam vs 727 $\mu$ M	TB
0 Jam vs 500 $\mu$ M	TB
0 Jam vs 250 $\mu$ M	TB
8 Jam vs 500 $\mu$ M	0,051
8 Jam vs 250 $\mu$ M-727 $\mu$ M	0,035
18 Jam vs 727 $\mu$ M-250 $\mu$ M	0,035
18 Jam vs 500 $\mu$ M-727 $\mu$ M	TB
24 Jam vs 727 $\mu$ M	TB
24 Jam vs 500 $\mu$ M-250 $\mu$ M	TB

**Tabel 4** Peran asam klorogenat terhadap *MiRNA 146 A*

	Adjusted			
	R	R Square	R Square	Durbin - Watson
Peran AK vs <i>miRNA 146 A</i>	0,924	0,853	0,707	1,566

Keterangan: Nilai  $R^2$  dihitung berdasarkan uji regresi linier berganda

Tabel 4 menyajikan data, AK sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi gen *miRNA 146 A* dengan koefisien determinan  $R^2 0,924$ . Berdasarkan nilai *adjusted R square* 70,7%.

### Pembahasan

Hasil uji normalitas dengan SPSS, diketahui bahwa data berdistribusi normal dengan nilai COV, kurang dari 30%. Uji lanjutan dilakukan dengan uji peran AK terhadap perbedaan waktu dan uji perbedaan dosis terhadap waktu nilai Cq *miRNA146 A*.

Berdasarkan uji viabilitas *Hep-G2* terhadap perbedaan waktu: 6 jam, 24 jam, 48, 72, dan 96 jam didapat 50% *Hep-G2* mati setelah 24 jam terpapar AK. Diperlukan uji viabilitas *Hep-G2* terhadap dosis AK untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  yang menunjukkan dosis tersebut mematikan 50% *Hep-G2* dan didapat nilai  $IC_{50}$  727  $\mu$ M.

Optimasi untuk kandidat *refrence gene*, dilakukan dengan bantuan mesin RT-

PCR CFX96, menggunakan 4 kandidat *reference gene*, yaitu *mir (micro RNA)-16*, *mir-21*, *mir-103* dan *mir-423-3p*. Masing-masing *mir* diwakili oleh 8 sampel (4 sampel sebelum intervensi dan 4 sampel setelah intervensi) dan total sampel dalam 2 kali pemeriksaan (*running reference gene* berjumlah 104 sampel termasuk 4 NTC (*non template controle*) dan 4 buah *spike*. Hasil pemeriksaan RT-PCR untuk mencari kandidat *reference gene* dianalisis dengan menggunakan *software Bio-Rad CFX Manager 2.1* (Hercules, California) dan *Normfinder*.

Berdasarkan analisis *normfinder*, nilai stabilitas terkecil (asumsi paling stabil) adalah 0,049 untuk *mir-103*, sedangkan kandidat kombinasi *reference gene* terbaik dan paling stabil adalah *mir-103* dan *mir-423-3p*. Kemudian, peneliti menganalisis hasil *software normfinder* dan dengan uji *t*. Hasil perbandingan diperoleh simpulan bahwa kandidat *reference gene* terpilih untuk *miRNA146 A* yang diberikan AK adalah *mir-423-3p* (Guller, 2008; Kim *et al.*, 2008).

AK menurunkan ekspresi gen *miRNA 146 A* pada sel KHS/Hep-G2. Ekspresi terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan asam klorogenat, yaitu pada dosis 727  $\mu\text{M}$  (0,85), diikuti 500  $\mu\text{M}$  (1,28) dan ekspresi tertinggi pada dosis 250  $\mu\text{M}$  (1,61). Pada jam ke-8 dan ke-18 nilai Cq *miRNA146 A* berbeda bermakna  $p < 0,05$  pada semua dosis AK (727, 500 dan 250  $\mu\text{M}$ ).

Terjadi penurunan ekspresi gen *miRNA146 A* dari 0 sampai dengan 24 jam akibat terpapar AK. Semakin besar dosis asam klorogenat maka ekspresi gen *miRNA146 A* semakin menurun. Kemudian, jika dibandingkan tiap waktu pemaparan (0, 8, 18 dan 24 jam) maka ekspresi *miRNA146 A* terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan asam klorogenat pada dosis 727  $\mu\text{M}$  (0,85), diikuti 500  $\mu\text{M}$  (1,28), ekspresi tertinggi pada dosis 250  $\mu\text{M}$  (1,61).

Berdasarkan uji *F repeated anova* pada tabel 1, AK mempengaruhi ekspresi

*miRNA146 A* berbeda bermakna pada jam 8, 18 dan 24. Hal ini terjadi, akibat adanya pengaruh paparan asam klorogenat. Kondisi ini disebabkan AK menekan/menghambat pertumbuhan sel Hep-G2, sehingga banyak Hep-G2 yang mati. Artinya, semakin sedikit *SBY Green* yang ditangkap/dibaca oleh RT-PCR akan menghasilkan nilai Cq-nya besar, jika dibandingkan dengan kontrol (tanpa paparan asam klorogenat).

AK sangat kuat berperan terhadap peningkatan ekspresi gen *miRNA146 A* dengan koefisien determinan  $R^2 0,924$  dan nilai *adjusted R square* 70,7%.

Peran asam klorogenat dalam menurunkan ekspresi gen *miRNA 146 A* pada sel Hep-G2, diperantarai oleh reaksi oksidasi-reduksi, berupa fosforilasi dan defosforilasi tingkat seluler melalui reseptor *single transmembrane segment tyrosine kinases* yang diperantarai oleh protein G yang dikenal dengan *GPCR (G-Protein Couple Receptor)* yang mempunyai 3 subunit reseptor yaitu  $\alpha$ ,  $\beta$ , dan  $\gamma$  (Rio *et al.*, 2010; Thuraw, 2010; Belkaid *et al.*, 2006; Kobilka, 2012). Reseptor  $\beta$  adalah reseptor yang berperan dalam mengaktifasi adenilat siklase, sehingga *cAMP* teraktifasi dan kemudian memfosforilasi protein *serine* (MAPKKK) menjadi *treonin* (MAPK) yang selanjutnya mengaktifkan *c-Fos- c-Jun*, mengaktifkan *CDK4* dan *6* serta diakhiri dengan penghambatan fase G1 ke S (Albert *et al.*, 2002). Asam klorogenat dapat juga menginduksi antioksidan endogen, sehingga aktifitas antioksidan endogen meningkat. Peningkatan stres oksidasi akan meningkatkan ROS yang tentunya akan meningkatkan proses fosforilasi (Hussain *et al.*, 2003; Federico *et al.*, 2007; Winarsi, 2007; Hussain *et al.*, 2007; Ramos, 2008).

ROS mengganggu keseimbangan lingkungan sel. Hal ini menambah aktifitas fosforilasi meningkat, aktifitas *NF-KB* meningkat yang diperantarai oleh gen *P50* dan *P65*, sehingga aktifitas *miRNA 146 A* meningkat (Schott & Stoecklin, 2010). Hal

ini menginformasikan bahwa target gen *NF-KB* adalah *miRNA 146 A*. Hal sebaliknya terjadi dengan *miRNA 146 A*, mempunyai aktifitas *feed back negatif* terhadap *IRAK 1, 4* dan *TRAF 6* dan target akhirnya adalah *NF-KB*. Ada *pathway* lain yang menyebutkan target *miRNA 146 A* adalah *NF-KB* melalui *c-Myc* dan *ERK5*. ROS sangat erat kaitannya dengan proses onkogenik (Wang *et al.*, 2008; Fernandez *et al.*, 2009). Jika aktifitas ROS meningkat, maka ekspresi *NF-KB* pun meningkat, demikian juga *miRNA 146 A* meningkat (Aaron *et al.*, 2009; Labbaye & Testa, 2012). *MiRNA 146 A* menghambat regulasi *IRF5*, *STAT-1*, *IRAK1*, *IRAK 2* dan *TRAF-6*. Apabila aktifitas *miRNA 146 A* meningkat, maka *IRF5*, *STAT-1*, *IRAK1*, *IRAK 2* dan *TRAF-6* aktifitasnya akan menurun (Labbaye & Testa, 2012; Esau *et al.*, 2012; Wang & Liu, 2007; Schott & Stoecklin, 2010).

Simpulan, asam klorogenat bersifat toksik terhadap *Cell Lines Hep-G2* dengan nilai  $IC_{50}=727 \mu\text{M}$ . Terdapat penurunan ekspresi gen *miRNA 146 A* pada sel *Hep-G2* yang diberikan AK. *Mir-423-3p* dapat dijadikan *reference gene* bagi *miRNA 146 A* pada senyawa aktif asam klorogenat.

Saran, digunakan sebagai data dasar penelitian molekuler sel *Hep-G2* seri 1886. Digunakan sebagai informasi ilmiah untuk mendukung teori onkogenesis. Asam klorogenat secara *in vitro* bersifat antikanker dan dapat digunakan untuk membantu pengobatan kanker hepatoseluler.

#### Daftar Pustaka

- Aaron J, Schetter AJ, Heegaard NHH and Curtis C. Harris. 2009. Inflammation dan cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. 31(1) 37-49.
- Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. The cell cycle and programmed cell death, molecular biology of the cell, 4<sup>th</sup> ed, chapter 17. www.ncbi.nlm.nih.gov. [23 agustus 2013]
- Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J and Annabi B. 2006. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. <http://www.biomedcentral.com>. [23 Agustus 2013].
- Chen G, Luo D, Dang Y, Feng Z. 2010. Detection of MicroRNA profile with bead-based microarray in hepatocellular carcinoma cell line HepG2. U.S. Chinese Journal of Lymphology and Oncology. 9(4):171-76
- Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, and Miller N. 2010. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. Biomed Central. 10(173): 1-13.
- Dahlan MS. 2009. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan, edisi ke-4. Jakarta: Salemba Medika. hlm. 54.
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, *et al.* 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. The Journal of Biological Chemistry. 279(5):52361-5.
- Fernandez SA, Ruiz MJ, Lawhon T, Zaknoen S, Ocio EM, *et al.* 2009. Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. [www.tragarapharma.com](http://www.tragarapharma.com). [23 Agustus 2013].
- Federico A, Morgillo F, Tuccillo C, Ciardiello F dan Loguercio C. 2007. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis. Int J cancer: 121:2381-86.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. 2003. Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer. 3:276-85.

- Hussain SP, Schwank J, Staib F, Wang XW, Harris CC. 2007. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogen*. 26: 2166–76
- Kobilka BK, Robert J. 2012. Studies of G-protein-coupled receptors. The royal swedish academy of sciences. <http://www.nobelprize.org>. [23 Agustus 2013].
- Labbaye C, Testa U. 2012. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 5(13):2-10.
- Masyhud. 2010. Lokakarya nasional tanaman obat Indonesia. Kementerian Kehutanan Republik Indonesia. <http://www.dephut.go.id>. [23 Agustus 2013].
- Nita ME, Alves VA, Carrilho FJ, Ono Nita SK, Mello ES dan Gama JJ. 2002. Molecular aspects of hepatic carcinogenesis. *Med. Trop.* 44(1):39-48
- Rakshit S, Mandal L, Pal BC, Bagchi J, Biswas N, Chaudhuri J, et al. 2010. Involvement of ROS in chlorogenic acid-induced apoptosis of Bcr-Abl<sup>+</sup> CML cells. *Pubmed*. 80(11):1662-75
- Registrasi kanker berbasis Rumah Sakit di Rumah Sakit Kanker Dharmais. 2012. Laporan 2003-2007. Jakarta.
- Rio DD, Stalmach A, Calani L, and Crozier A. 2010. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Journal Nutriens*. 2:820-33.
- Ramos S. 2008. Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol. Nutr. Food Res*. 52:507-26.
- Schott J, Stoecklin G. 2010. Networks controlling mRNA decay in the immune system. *John Wiley & Sons*. 1(3):432-56
- Sukohar A, Kurnia D, Setiawan, Wirakusumah FF, Sastramihardja HS. 2012. Isolation and characterization cytotoxic compounds caffeine and chlorogenic acid seeds of Lampung Robusta Coffee. *JUKE*. 2(2):17-26.
- Sukohar A, Sastramihardja HS. 2012. Antioksidan ekstrak air biji kopi Robusta Lampung dalam menghambat degenerasi sel hati tikus model hepatitis yang diinduksi CCL4. *MKB*. 44(3):127-32.