

Peran Asam Klorogenat Terhadap Ekspresi Gen; *miRNA 146 A*, *Caspase 3*, *Cyclin D1*, dan Kematian Sel Kanker Hepatoseluler Model Cell Lines Hep-G2

ASEP SUKOHAR¹, HENING HERAWATI², ARIEF B WITARTO³, SETIAWAN⁴, FIRMAN F. WIRAKUSUMAH⁵, HERRY S. SASTRAMIHARDJA⁶

¹Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Lampung

²Bagian Penelitian dan Pengembangan Biologi Molekuler RS Kanker "Dharmais"

³Bagian Penelitian dan Pengembangan Biologi Molekuler RS Kanker "Dharmais"

⁴Bagian Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

⁵Bagian Obstetri dan Ginekologi Pascasarjana Universitas Padjadjaran

⁶Bagian Farmakologi dan Terapi Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran

Diterima 14 Januari 2014; Direview 23 Januari 2014; Disetujui 1 Maret 2014

ABSTRACT

*Chlorogenic acid (CA) is the active compound isolated from medicinal plants, can be used as a chemopreventive agents of hepatocellular cancer (HCC). It works as an exogenous antioxidant and inhibit growth of cancer cells through the inhibition of free radicals. The purpose of this study is to know mechanism of CA in inhibition to growth of Hep-G2 through apoptosis stimulation. In vitro study was performed Hep-G2 cells. The samples were divided into the control group treatment and experiment group expose to 727, 500 and 250 μ M and 3 times repetition. Expression of *miRNA 146 A*, *caspase 3* and *cyclin D1* examined by RT-PCR CFX-96. Samples were analysed at 0, 8, 18, and 24 hours after exposure CA. The data were statistically tested by repeated measurement, pearson, and multivariate regression. The results showed that cell death of Hep-G2 were increase as the dose increase and time, at 8 hours after exposure CA cell death of Hep-G2 increased as much as 35,68, 37,75, 40,86%. At 18 hours cell death of Hep-G2 increased as much as 54,56, 56,48, and 59,73%. At 24 hours cell death of Hep-G2 increased as much as 67,73, 69,37, and 72,16%. The lowest expression *miRNA 146 A* in group 24 hours after exposure at doses of 727 μ M CA (0,85), followed by 500 μ M (1,28) and the highest expression at a dose of 250 μ M (1,61). The result of repeated measurement test: *miRNA 146 A* and *caspase 3* at 8th and 18th hours was significantly different to the 24th with $p < 0.05$. The expression of *caspase 3* increase from 0-24 hours, the highest expression of *caspase 3* in group 18 hours after exposure at doses CA at 750 μ M (3,86). After 18 hours, expression *caspase 3* decreased and the lowest in group 24 hours after exposure: at a dose of 250 μ M (1,52). Expression of *cyclin D1* decrease from 0-24 hours with the highest expression at 0 hours (4,35) at a dose of 250 μ M and the lowest expression at 24 hours after exposure to CA (0,32) at a dose of 727 AK μ M.*

*The results with Tamhane multiple comparisons: significantly different at the 8th hours at dose 250 μ M compared 727 μ M with $p < 0,05$. At the 24 hours differ significantly at doses of 500 μ M compared of 250 μ M $p < 0.05$. A weak negative correlation, between *miRNA 146 A* with *caspase 3* with $r = -0.634$ and $p < 0,05$. Strong negative correlation, between *miRNA 146 A* with the death of Hep-G2 with $r = 0.785$ and $p < 0,05$. A weak positive correlation between *miRNA 146 A* with *cyclin D1* with $r = 0.664$ and $p < 0,05$. Strong positive correlation between *caspase 3* with the cell death of Hep-G2 with $r = 0,708$ and $p < 0,05$. Strong positive correlation, between the death of Hep-G2 and *cyclin D1* with $r = 0,997$ and $p < 0,05$. A weak positive correlation, between *cyclin D1* and *caspase 3* with $r = 0,623$ and $p < 0,05$. Conclusions: that CA a potent substance decreased gene expression of *miRNA 146 A*, increased gene expression of *caspase 3*, decreased gene expression of *cyclin D1*, and increased the member of form of cell death. There are correlation between decreasing gene expression of *miRNA 146 A*, increasing gene expression of *caspase 3*, decreasing gene expression of *cyclin D1*, increasing the member of form of cell death.*

Keyword: *Chlorogenic acid, caspase 3, cyclin D1, Histopathological picture of Hep-G2, hepatocellular carcinoma, miRNA 146 A.*

KORESPONDENSI:

dr. Asep Sukohar, Mkes
Bagian Farmakologi dan
Terapi Fakultas Kedokteran
Universitas Lampung.
Jl. Prof. Dr. Sumantri
Brojonegoro No. 1
Bandar Lampung, 35145.
Email : asepsukohar@
gmail.com

ABSTRAK

Asam klorogenat (AK) merupakan senyawa aktif diisolasi dari tanaman obat, dapat dijadikan terapi kemopreventif kanker hepatoseluler (KHS). Zat tersebut diduga bekerja sebagai antioksidan eksogen, dan berperan sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan radikal bebas.

Tujuan penelitian untuk memahami mekanisme kerja AK dalam menghambat pertumbuhan KHS dengan model *cell lines Hep-G2* melalui induksi apoptosis. Penelitian dilakukan pada 72 kelompok sampel. Satu kelompok sel terdiri dari 250 ribu sel kanker. Sampel dibagi dalam kelompok treatment dan kelompok yang terpapar 727, 500 dan 250 dan dilakukan 3 kali pengulangan pemeriksaan. Peran ke-3 dosis AK terhadap *Hep-G2* dianalisis dengan membandingkan ekspresi *miRNA 146 A*, *caspace 3* dan *cyclin D1* 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 peningkatan kematian sel *Hep-G2* sejalan dengan meningkatnya dosis dan waktu, pada 8, 18 dan 24 jam setelah terpapar AK. Terjadi peningkatan kematian sel *Hep-G2* dengan meningkatnya dosis dan waktu, pada 8 jam setelah terpapar AK sebanyak 35,68, 37,75, 40,86%. Pada 18 jam setelah terpapar AK terjadi peningkatan kematian *Hep-G2* sebanyak 54,56, 56,48 dan 59,73%. Pada 24 jam setelah terpapar AK terjadi peningkatan kematian *Hep-G2* sebanyak 67,73, 69,37, dan 72,16%. Terjadi penurunan ekspresi *miRNA 146 A*, terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan AK pada dosis 727 μM (0,85), diikuti 500 μM (1,28) dan ekspresi tertinggi pada dosis 250 μM (1,61), dilanjutkan dengan uji statistik pada jam ke-8 dan jam ke-18 nilai Cq *miRNA 146 A* berbeda bermakna $p < 0,05$ pada semua dosis AK. Terjadi peningkatan ekspresi *caspace 3* dari 0 jam sampai dengan 24 jam, ekspresi *caspace 3* tertinggi pada kelompok 18 jam setelah pemaparan AK pada dosis 750 μM dengan nilai ekspresi 3,86. Setelah 18 jam ekspresi *caspace 3* menurun kembali dan ekspresi *caspace 3* terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan: pada dosis 250 μM (1,52), dilanjutkan uji statistik pada jam ke-18 dan ke-24 $p < 0,05$ pada semua dosis AK. Terjadi penurunan ekspresi *cyclin D1* dari 0 jam sampai dengan 24 jam dengan nilai ekspresi tertinggi pada 0 jam dengan nilai (4,35) pada dosis 250 μM dan ekspresi terendah pada 24 jam setelah terpapar AK dengan nilai (0,32) pada dosis AK 727 μM , dilanjutkan dengan uji statistik berbeda bermakna maka pada jam ke-8 pada dosis 250 μM dibandingkan dosis 727 μM $p < 0,05$, jam ke-24 berbeda bermakna pada dosis 500 μM dibandingkan dosis 250 μM $p < 0,05$.

Hasil uji *multiple comparisons-Tamhane* berbeda bermakna pada jam ke-8 pada dosis 250 μM dibandingkan dosis 727 μM $p < 0,05$, jam ke-24 berbeda bermakna pada dosis 500 μM dibandingkan dosis 250 μM $p < 0,05$. Korelasi negatif yang lemah, antara *miRNA 146 A* dengan *caspace 3* dengan $r = -0,634$ dan $p < 0,05$. Korelasi negatif yang kuat, antara *miRNA 146 A* dengan kematian *Hep-G2* dengan $r = 0,785$ dan $p < 0,05$. Korelasi positif lemah antara *miRNA 146 A* dengan *cyclin D1* dengan $r = 0,664$ dan $p < 0,05$. Korelasi positif yang kuat antara *caspace 3* dengan

kematian *Hep-G2* dengan $r = 0,708$ dan $p < 0,05$. Korelasi positif yang kuat, antara kematian *Hep-G2* dan *cyclin D1*, dengan $r = 0,997$ dan $p < 0,05$. Demikian juga terdapat positif yang lemah, antara *cyclin D1* dengan *caspace 3* dengan $r = 0,623$ dan $p < 0,05$.

Simpulan penelitian adalah AK sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi *miRNA 146 A*, peningkatan ekspresi *caspace 3*, penurunan ekspresi *cyclin D1* dan peningkatan kematian sel *Hep-G2*. Terdapat korelasi yang kuat, antara penurunan ekspresi *miRNA 146 A* dengan peningkatan kematian sel *Hep-G2*, korelasi yang lemah antara *miRNA 146 A* dengan *caspace 3* dan *cyclin D1*.

Kata Kunci: Asam klorogenat, *caspace 3*, *cyclin D1*, kematian sel *Hep-G2*, kanker hepatoseluler, *miRNA 146 A*.

PENDAHULUAN

Kanker menjadi masalah serius di berbagai negara di dunia, termasuk di Indonesia. Prevalensi kanker di dunia cenderung meningkat. Berdasarkan laporan *International Agency for Research on Cancer (IARC)*, pada 2008 ditemukan lebih dari 12 juta kasus kanker baru di dunia. Laporan tersebut menyebutkan bahwa jumlah kasus kanker di dunia meningkat 2 kali lipat dalam 30 tahun terakhir. Bila tidak dilakukan upaya penanggulangan global yang signifikan, diperkirakan akan meningkat 3 kali lipat pada 2030.¹

Berkenaan dengan hal di atas, perlu ada upaya memanfaatkan obat herbal sebagai pengobatan tradisional untuk mengatasi kanker. Obat herbal tersebut dapat diperoleh dari jenis tumbuhan yang memiliki khasiat. Jenis tumbuhan tersebut dapat diperoleh dari 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.²

Berdasarkan data yang telah dipublikasi, senyawa aktif asam klorogenat yang telah diisolasi dari kopi robusta Lampung mempunyai aktivitas sebagai antikanker. Khasiat asam klorogenat lain adalah menghambat pertumbuhan *cell line cancer*, mencegah kerusakan DNA, protein, dan kerusakan dinding sel secara *in vitro*.³⁻⁵

Penelitian ini menemukan suatu *pathway* baru *miRNA 146 A*, *caspace 3*, dan *cyclin D1*, serta digunakan sebagai informasi ilmiah untuk mendukung teori onkogenesis.

MATERI DAN METODE

Penelitian deskriptif dan eksperimental murni dilakukan terhadap *Cell Lines (Hep-G2, No:1886)* yang didapat melalui *Riken Cell Bank-Tohoku University*, dikultur di Laboratorium Biologi Molekuler Rumah Sakit Kanker “Dharmas” dengan kriteria inklusi: *Cell Lines Hep-G2* didapat dari induk yang sama, tumbuh pada media kultur sehingga mencapai *confluent* 60—80%.

Cell lines Hep-G2 1886 dikultur menggunakan *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)* dari Gibco nomor katalog 11965, 10% *fetal bovine serum (FBS)* dari Gibco nomor katalog 26140, dan 1% penisilin-streptomisin dari sigma dengan nomor katalog P4333. Sel dikultur dalam inkubator pada suhu 37°C, kelembaban 5% CO₂, dan medium diganti setiap 2 hari.

Pemberian asam klorogenat pada kultur *Cell Lines Hep-G2* dilakukan pada hari ke-4 kultur pada saat 60% *confluent* (~ 8x10⁴ cell/cm²).

Sampel dikelompokkan dalam 4 kelompok besar (0, 8, 18, dan 24 jam); tiap kelompok terdiri dari 18 sumuran. Sampel diberi AK dosis 727, 500, dan 250 µM, dibandingkan antara sebelum dan sesudah pemaparan AK. Masing-masing kelompok dilakukan pengulangan 3 kali. Total sampel adalah 72 kelompok *Cell Line Hep-G2*, kemudian diintervensi AK dan diperiksa dengan RT-PCR. Dosis IC₅₀ AK: 727 µM didapat dengan melakukan serial uji sitotoksitas dan peneliti menambah variasi dosis 250 dan 500 µM.

Penelitian ini dibagi 3 tahap. Tahap pertama mengenai isolasi dan karakterisasi asam klorogenat telah dilaporkan dan dipublikasi.³⁻⁴ Kemudian, dilanjutkan tahap kedua, yaitu uji MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Penelitian tahap ketiga adalah menganalisis peran asam klorogenat terhadap ekspresi gen; *miRNA 146 A*, *caspase 3*, dan *cyclin D1*, serta gambaran histopatologi pada *Cell Line Hep-G2 1886*.

Optimasi untuk kandidat *reference gene miRNA 146 A* 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*. Primer reverse dan forward *miRNA 146 A* menggunakan kode produk *Exicon: 204688*, primer *Caspase-3* (nomor kode produk BioRad FB-6400-05) forward 5'-AGAAGTGGACTGTGGCATTGAG-3', reverse primer: 5'-ATGTGCTGTGACTGCTTGATAG-3', dan primer *Cyclin D1* (nomor kode produk FB-6400-05): forward 5'-GCATGTTTCGTGGCCTTAAGA-3', reverse 5'-CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC-3' didapat dari BioRad

melalui PT Scienwerke. Primer *Gen Beta Actin*: forward Forward: 5'- TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'. Reverse: 5'- GGCATGGACTGTGGTCATGA-3'.

Masing-masing *mir* diwakili oleh 8 sampel (4 sampel sebelum intervensi dan 4 sampel setelah intervensi). Total sampel dalam 2 kali pemeriksaan (*running*) *reference gene* berjumlah 104, termasuk 4 NTC (*non templete controle*) dan 4 buah *spike*. Hasil pemeriksaan RT-PCR untuk mencari kandidat *reference gene* dianalisis menggunakan *software Bio-Rad CFX Manager 2.1 (Hercules, California)* dan *Normfinder*. Berdasarkan hasil analisis *Normfinder* maka *mir-423-3p* digunakan sebagai *reference gene* untuk *miRNA 146 A*.⁶

Optimasi dilakukan terhadap *caspase 3* dan *cyclin D1* untuk mencari suhu *annealing* RT-PCR dengan cara melakukan gradien suhu sesuai dengan protokol *Exiqon* dan *Bio-rad*.

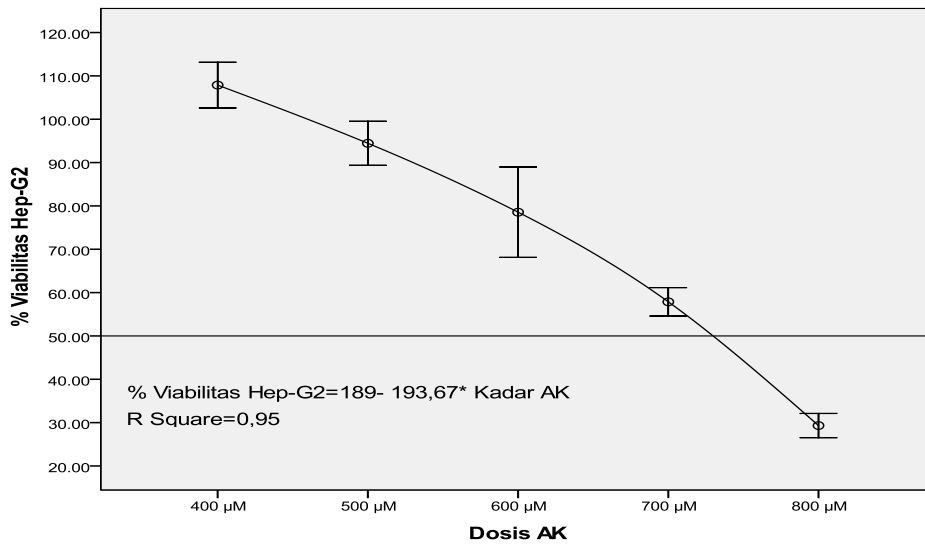
Setelah kandidat *reference gene* dan suhu optimum didapat, dilanjutkan dengan memaparkan 3 dosis AK pada tiap sumuran sesuai dengan waktu yang telah ditentukan (0, 8, 18 dan 24 jam); dilakukan isolasi RNA; dibuat cDNA; dan dilakukan pemeriksaan ekspresi gen dengan mesin RT-PCR CFX-96.

Data dianalisis dengan uji *repeated measurement*, uji *repeated measurement*, dan *pairwise comparisons*. 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 R².

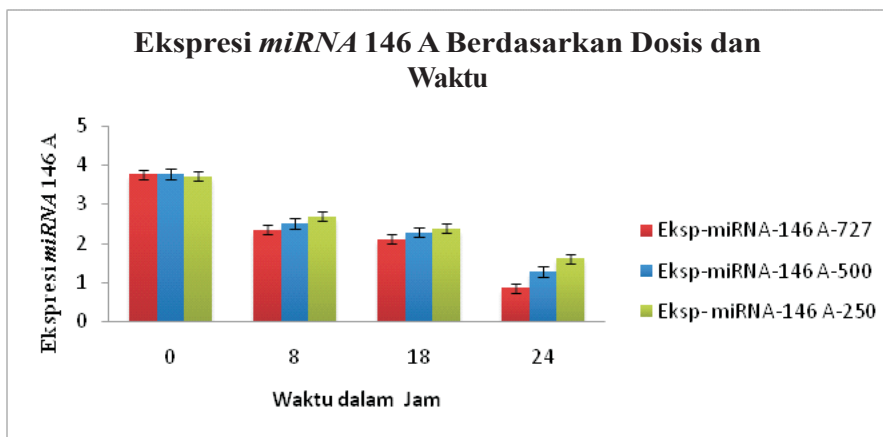
HASIL

Nilai IC₅₀ AK 727 µM didapat dari serial uji sitotoksitas. Kemudian peneliti menambahkan variasi dosis 500 dan 250 µM untuk menganalisis variasi dosis terhadap ekspresi gen.⁷ Analisis ekspresi gen *miRNA 146 A* menggunakan metode Livak dengan rumus: 2^{-ΔΔCq}. 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 ΔCq. Nilai ΔΔCq, ditentukan dengan mengurangkan nilai ΔCq target terhadap ΔCq *reference*.⁸

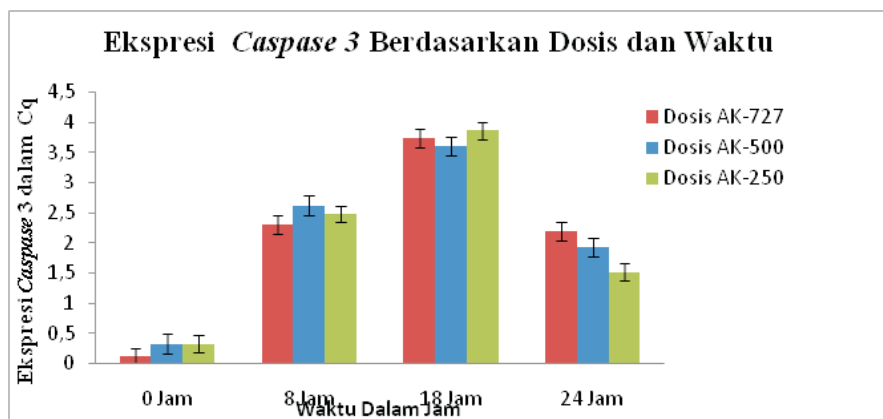
Dosis IC₅₀ AK dilakukan dengan 5 serial uji toksitas dimulai dari 400, 500, 600, 700, dan 800 µM. Hasil dianalisis menggunakan statistik dengan nilai IC₅₀ 727 µM.



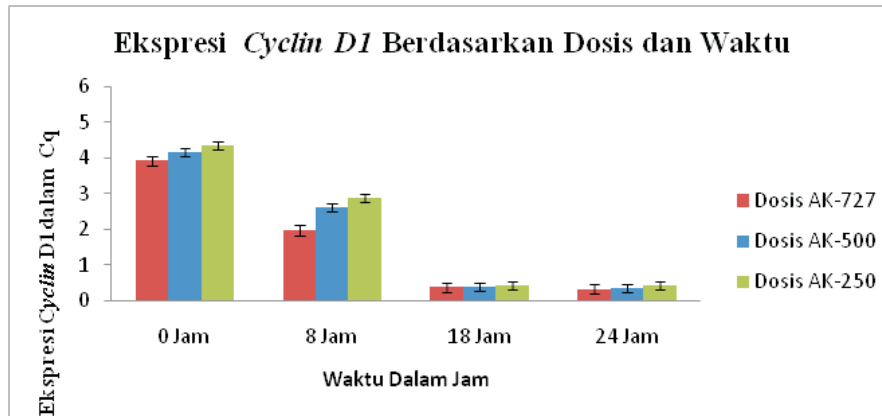
Gambar 1: Persentase Hep-G2 yang hidup dan persamaan regresi linear IC_{50} asam klorogenat



Gambar 2: Ekspresi miRNA 146 A berdasarkan dosis asam klorogenat 727, 500, 250 μM terhadap waktu 0, 8, 18, dan 24 Jam



Gambar 3: Ekspresi Caspase 3 berdasarkan dosis asam klorogenat 727, 500, 250 μM terhadap Waktu 0, 8, 18, dan 24 jam



Gambar 4: Ekspresi Cyclin D1 berdasarkan dosis asam klorogenat 727, 500, 250 µM terhadap Waktu 0, 8, 18, dan 24 Jam

Tabel 1: Persentase kematian sel Hep-G2 sebelum dan sesudah pemaparan asam klorogenat 727, 500, dan 250 µM berdasarkan pewarnaan *methylen blue*

Jumlah Hep-G2	0 Jam	8 Jam Sebelum Pemaparan	8 Jam Sesudah Pemaparan	18 Jam Sebelum Pemaparan	18 Jam Sesudah Pemaparan	24 Jam Sebelum Pemaparan	24 Jam Sesudah Pemaparan
SD 727 µM	2,52	11,53	5,03	11,53	9,07	6,08	2,08
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	54,14%	95%	35,53%	94%	21,84%
Jumlah Sel mati	0%		40,86%		59,37%		72,16%
SD 500 µM	2,52	11,53	9,07	11,53	7	6,08	4,93
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	57,25%	95%	38,52%	94%	24,63%
Jumlah Sel mati	0%		37,75%		56,48%		69,37%
SD 250 µM	2,52	11,53	7	11,53	3,21	6,08	2,52
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	59,32%	95%	40,44%	94%	26,27%
Jumlah Sel mati	0%		35,68%		54,56%		67,73%

SD=standar deviasi

Tabel 2: Peran asam klorogenat terhadap miRNA 146 A, Caspase 3, Cyclin D1, dan kematian Sel Hep-G2

	R	R Square	Adjusted R Square	Durbin – Watson
Peran AK vs Kematian Hep-G2	0,958	0,918	0,837	2,13
Peran AK vs miRNA 146 A	0,924	0,853	0,707	1,566
Peran AK vs caspase 3	0,973	0,946	0,893	1,894
Peran AK vs cyclin D1	0,934	0,873	0,746	2,14

Keterangan: Nilai R2 dihitung berdasarkan uji regresi linier berganda

Gambar 2 menunjukkan 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 μM (0,85), kemudian ekspresi meningkat pada dosis 500 μM (1,28), dan ekspresi tertinggi pada dosis 250 μM (1,61).

Gambar 3 menunjukkan ekspresi *caspase 3* tertinggi pada kelompok 18 jam setelah pemaparan asam klorogenat pada dosis 250 μM dengan nilai ekspresi 3,86. Setelah 18 jam ekspresi *caspase 3* kembali menurun. Jika dibandingkan dengan ekspresi *caspase 3* pada jam ke-8, 18, dan 24 maka ekspresi *caspase 3* terendah terdapat pada kelompok 24 jam, setelah pemaparan pada dosis 250 μM (1,52).

Gambar 4 menunjukkan ekspresi *cyclin D1* menurun dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Jika dibandingkan dengan tiap waktu pemaparan (0, 8, 18, dan 24 jam) maka ekspresi *cyclin D1* terendah adalah pada dosis 727 μM dalam kelompok 18 dan 24 jam.

Setelah pemaparan asam klorogenat 727 μM , tabel 1 memberikan gambaran bahwa terjadi peningkatan kematian jumlah *Hep-G2* dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian 40,86% terjadi pada 0–8 jam; 59,37% terjadi pada 0–18 jam; dan peningkatan kematian *Hep-G2* 72,16% terjadi pada 0–24 jam. Dosis AK 500 μM pada tabel 1 memberikan gambaran bahwa terjadi peningkatan kematian jumlah *Hep-G2* dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian sebesar 37,75% terjadi pada 0–8 jam; 56,48% terjadi pada 0–18 jam; dan 69,37% terjadi pada 0–24 jam. Dosis AK 250 μM pada tabel 1 memberikan gambaran bahwa terjadi peningkatan kematian jumlah *Hep-G2* dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian sebesar 35,68% terjadi pada 0–8 jam; 54,56% terjadi pada 0–18 jam, dan peningkatan kematian *Hep-G2* 67,73% terjadi pada 0–24 jam.

Tabel 2 menyajikan data bahwa AK sangat kuat berperan terhadap kematian sel *Hep-G2* dengan koefisien determinan R^2 0,958 berdasarkan nilai *adjusted R square* 83,7%. Asam klorogenat juga sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi gen *miRNA 146 A* dengan koefisien determinan R^2 0,924 berdasarkan nilai *adjusted R square* 70,7%. Asam klorogenat sangat kuat berperan terhadap kenaikan ekspresi *caspase 3* dengan koefisien determinan R^2 0,946 dan berdasarkan nilai *adjusted R square* 89,3%.

Demikian juga asam klorogenat, sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi *cyclin D1*

dengan koefisien determinan R^2 0,934. Berdasarkan nilai *adjusted R square* 74,6% penurunan ekspresi *cyclin D1* disebabkan oleh asam klorogenat.

PEMBAHASAN

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 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 μM . IC_{50} hasil penelitian lebih baik jika dibandingkan yang dilakukan oleh Ramos pada 2005 dan 2011.⁹⁻¹⁰

AK menurunkan ekspresi *miRNA 146 A* pada sel KHS/*Hep-G2* melalui mekanisme penurunan aktivitas ROS yang selanjutnya terjadi penurunan ekspresi NF-KB.¹¹⁻¹⁴ Pathway lain menyebutkan target *miRNA 146 A* adalah NF-KB melalui *c-Myc* dan *ERK5*.¹⁵⁻¹⁶ Ekspresi terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan asam klorogenat, yaitu pada dosis 727 μM (0,85), diikuti 500 μM (1,28), dan ekspresi tertinggi pada dosis 250 μM (1,61). Pada jam ke-8 dan ke-18 nilai Cq *miRNA 146 A* berbeda bermakna $p < 0,05$ pada semua dosis AK (727, 500 dan 250 μM). Ghan Chen melakukan penelitian terhadap ekspresi *miRNA 146 A* tanpa disertai intervensi senyawa aktif dengan nilai ekspresi 10.¹⁷

AK meningkatkan ekspresi *caspase 3* pada sel KHS/*Hep-G2*. Ekspresi *caspase 3* tertinggi pada kelompok 18 jam setelah pemaparan AK dosis 727 μM dengan nilai ekspresi 3,86. Setelah 18 jam, ekspresi *caspase 3* menurun kembali dan ekspresi *caspase 3* terendah pada kelompok 24 jam pada dosis 250 μM (1,52). Pada jam ke-18 dan ke-24, nilai Cq *caspase 3* berbeda bermakna $p < 0,05$ pada semua dosis AK (727, 500 dan 250 μM).

AK menurunkan ekspresi *cyclin D1* pada sel KHS/*Hep-G2* melalui *receptor tyrosine kinase* (RTK), dilanjutkan mengaktivasi MAPKKK menjadi MAPKK, MAPK, *c-Fos* dan *c-Jun*, serta diakhiri dengan mengaktifasi CDK4 dan 6.^{18, 19} Ekspresi tertinggi pada kelompok 0 jam dan ekspresi terendah pada 24 jam setelah terpaparkan AK dengan nilai 0,32 pada dosis 727 μM . Ekspresi *cyclin D1* berbeda bermakna pada jam ke-8 pada dosis 250 μM dibandingkan dosis 727 μM $p < 0,05$; jam ke-24 berbeda bermakna pada dosis 500 μM dibandingkan dosis 250 μM $p < 0,05$.

AK meningkatkan kematian sel *Hep-G2*. Kematian *Hep-G2* meningkat seiring dengan meningkatnya dosis (250, 500, dan 727 μM) dan waktu. Pada 8

jam setelah terpapar AK, kematian *Hep-G2* sebanyak 35,68%; 37,75%; 40,86%; pada 18 jam sebanyak 54,56%; 56,48%; dan 59,73%, serta pada 24 jam terjadi peningkatan kematian *Hep-G2* sebanyak 67,73%; 69,37%; dan 72,16%.

AK sangat kuat berperan terhadap kematian sel *Hep-G2* dengan koefisien determinan R^2 0,958 dengan nilai *adjusted R square* 83,7%. AK juga sangat kuat berperan terhadap peningkatan ekspresi gen *miRNA 146 A* dengan koefisien determinan R^2 0,924 dan nilai *adjusted R square* 70,7%. Asam klorogenat sangat kuat berperan terhadap kenaikan ekspresi *caspase 3* dengan koefisien determinan R^2 0,946 dan nilai *adjusted R square* 89,3%; serta sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi *cyclin D1* dengan koefisien determinan R^2 0,934 dan nilai *adjusted R square* 74,6%.

SIMPULAN

Asam klorogenat sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi *miRNA 146 A*, peningkatan ekspresi *caspase 3*, penurunan ekspresi *cyclin D1*, dan peningkatan kematian sel *Hep-G2*.

Terdapat korelasi yang kuat antara penurunan ekspresi *miRNA 146 A* dengan peningkatan kematian sel *Hep-G2*, serta korelasi yang lemah antara *miRNA 146 A* dengan *caspase 3* dan *cyclin D1*.

Mir-423-3p dapat dijadikan *reference gene* bagi *miRNA 146 A* pada senyawa aktif asam klorogenat.

DAFTAR PUSTAKA

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistic. *Cancer J Clin*. 2011; 61(2): 69-90. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Masyhud. Lokakarya Nasional Tanaman Obat Indonesia. Kementerian Kehutanan Republik Indonesia [web online] 2010. [diunduh 15 April 2013]. Melalui: <http://www.dephut.go.id>.
- Sukohar A, Kurnia D, Setiawan, Wirakusumah FF, Sastramihardja HS. Isolation and characterization cytotoxic compounds caffeine and chlorogenic acid seeds of Lampung Robusta Coffee. *JUKE* 2012;2(2):17-26.
- Sukohar A, Sastramihardja HS. Antioksidan ekstrak air biji kopi Robusta Lampung dalam menghambat degenerasi sel hati tikus model hepatitis yang diinduksi CCL4. *MKB* 2012;44(3):127-32.
- European. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coffee, including chlorogenic acids from coffee, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage, maintenance of normal blood glucose concentrations, and contribution to the maintenance or achievement of a normal body weight. Parma: Italy. *EFSA Journal*. 2011;9(4):2057. Melalui: <http://www.efsa.europa.eu>.
- Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res*. 2004 Agus; 64(15): 5245-5250. [diunduh 4 oktober 2012]. Melalui: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.
- Ramos S, Aliaa M, Bravo L, And Goya L. Comparative Effects of Food-Derived Polyphenols on the Viability and Apoptosis of a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 2005 Feb 23 [diunduh 10 Juni 2011]; 53(4):1271-80. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) *Method* 2001;25(4):402-08.
- Ramos S, Aliaa M, Bravo L, And Goya L. Comparative Effects of Food-Derived Polyphenols on the Viability and Apoptosis of a Human Hepatoma Cell Line (HepG2). *J Agric Food Chem*. 2005 Feb 23.
- Wilkening S, Stahl F, and Bader A. Comparison of Primary Human Hepatocytes and Hepatoma Cell Line HepG2 With Regard to Their Biotransformation Properties. 2003.NCBI. MicroRNA 146a [*Homo sapiens*]. updated 7Aug 2011. [diunduh 11 Agustus 2011]. Tersedia di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20124483>.
- Labbaye C, and Testa U. The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *Journal of Hematology & Oncology*. 2012 5(13): 2-10.
- Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, et al. MicroRNA-143 Regulates adipocyte differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004. 279(5): 52361-5.
- Wang X, Liu Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. 2007.
- Schott J and Stoecklin G. Networks controlling mRNA decay in the immune system. John Wiley & Sons; 2010.
- Wang J, Wang H, Li Z, Wu Q, Lathia JD, McLendon RE, et al. c-Myc Is Required for Maintenance of Glioma *Cancer Stem Cells*. 2008; 3(11): 1-11.
- Fernandez SA, Ruiz MJ, Lawhon T, Zaknoen S, Ocio EM, et al. Potent antimyeloma activity of a novel ERK5/CDK inhibitor. 2009.
- Chen G, Luo D, Dang Y, Feng Z. Detection of MicroRNA Profile with Bead-based Microarray in Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. U.S. *Chinese Journal of Lymphology and Oncology*. 2010; 9(4):171-76.

18. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts k, Walter P. The Cell Cycle and programmed Cell Death, Molecular Biology of The Cell, 4th ed, chapter 17.2002.985.
19. Wang X, Liu Y. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. 2007.