Potensi Ekstrak Etanol 96% Daun Salam (*Syzigium polyanthum* Wight. (Walp.)) terhadap Ekspresi p53 pada Sel Kanker HeLa Cell Lines

The Potency of 96% Ethanol Extract of Indonesian Bay Leaves (*Syzigium polyanthum* Wight. (Walp.)) on p53 Expression on HeLa Cell Lines

Wahyu Hidayati¹, Landyyun Rahmawan Sjahid¹, Wahyu Ismalasari¹, Kusmardi Kusmardi^{2*}

¹Fakultas Farmasi dan Sains, Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka, Jakarta, Indonesia

²Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia

*E-mail: kusmardi_ms@ui.ac.id

Diterima: 15 Juli 2019

Direvisi: 24 Maret 2020

Disetujui: 6 April 2020

Abstrak

Daun salam (*Syzigium polyanthum* Wight. (Walp.)) telah digunakan sebagai salah satu obat tradisional di Indonesia, akan tetapi eksplorasi daun salam terhadap sel kanker belum banyak dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol 96% daun salam dalam meningkatkan ekspresi p53 pada sel kanker serviks HeLa cell lines. Penelitian ini diawali dengan pembuatan ekstrak menggunakan pelarut etanol 96% dilanjutkan dengan penapisan fitokimia, dan uji ekstrak terhadap sel HeLa dengan metode imunohistokimia. Pengamatan ekspresi protein p53 dilakukan menggunakan software ImageJ Profiler Plugin versi 1.52a. Data H-score diolah menggunakan One-Way ANNOVA program IBM SPSS versi 20 dan dilanjutkan dengan analisis Post Hoc menggunakan Duncan test. Identifikasi ekstrak etanol 96% daun salam mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, fenol, terpenoid, dan steroid. Berdasarkan hasil uji Post Hoc, pemberian ekstrak etanol 96% daun salam dengan tiga variasi dosis (156 µg/ml, 234 µg/ml, 312 µg/ml) dan kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan, sedangkan dosis tinggi (312 µg/ml) tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif. Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak etanol 96% daun salam pada dosis 312 µg/ml dapat menghambat ekspresi protein p53 mutan pada sel kanker serviks HeLa cell lines.

Kata kunci: Kanker serviks; p53; Ekstrak etanol; *Syzigium polyanthum*

Abstract

Bay leaves (*Syzigium polyanthum* Wight. (Walp.)) have been utilized as one of traditional medicines in Indonesian. However, the potency of the leaves for cancer treatment has not been well-explored. The aim of this study is to determine the expression of p53 tumor suppressor gene after administration of 96% ethanol extract of Bay leaves on HeLa cell lines. This study is begin by making extract using ethanol 96% as a solvent followed by phytochemical screening and extract evaluation of HeLa cells by immunohistochemistry. The observation of p53 protein expression is conducted using the Image J Profiler Plugin software 1.52a version. The H-score data is processed using the One-Way ANNOVA IBM SPSS 20 version program and continued with Post Hoc analysis using the Duncan test. The identification of 96% ethanol extract result showed that bay leaves contain flavonoids, alkaloids, saponins, phenols, terpenoids, and steroids. Based on the Post Hoc test results, the administration of 96% ethanol extract bay leaves with three dose variations (156 µg/ml, 234 µg/ml, 312 µg/ml) and negative control had significant differences, while the high dose (312 µg/ml) had not significant differences to positive control. The result showed that 96% ethanol extract of bay leaves by the dose of 312 µg/ml can inhibit the expression of mutant p53 protein in cervical cancer cells HeLa cell lines.

Keywords: Cervical cancer; p53; Ethanolic extract; *Syzigium polyanthum*

PENDAHULUAN

Pada tahun 2018, secara global, diperkirakan sebanyak 18,1 juta kasus kanker dengan jumlah kematian sebesar 9,6 juta. Pada wanita, kanker serviks menduduki peringkat ke-4 dunia dengan angka kejadian 6,6% dan angka kematian 7,5%.¹ Secara nasional, pada tahun 2018, kanker serviks berada pada urutan kedua penyakit kanker yang terjadi pada wanita, baik pada jumlah kejadian maupun angka kematian. Jika dibandingkan dengan kanker payudara, persentase angka kejadian kanker serviks 7,4% lebih rendah sedangkan persentase *case fatality rate* kanker payudara lebih tinggi daripada kanker serviks (8%).²

Kanker leher rahim atau kanker serviks merupakan penyakit kanker yang disebabkan oleh infeksi *Human Papilloma Virus* (HPV).³ Infeksi HPV mampu menstimulasi proses karsinogenesis pada sel epitel serviks melalui HPV-Encoded viral oncoproteins, E6 dan E7, yang akan menghambat aktivasi dari *tumor suppressor gene*.⁴ Salah satu *tumor suppressor gene* adalah p53 yang dapat mengendalikan mekanisme apoptosis pada sel. Mekanisme lain yang dilakukan oleh p53 untuk mencegah terjadinya pertumbuhan tumor dengan meningkatkan ekspresi protein p53 pada akhir fase G1 pada sel yang mengalami transformasi. Hal ini dilakukan sebagai respon akibat adanya kondisi tidak normal pada suatu sel sehingga sel tersebut tidak dapat melanjutkan proses siklus sel akibat terhambatnya tahap interfase.⁵

Brown dan Wouters melaporkan bahwa p53 dapat digunakan untuk mengetahui sensitivitas sel kanker. Penelitian tersebut menginisiasi berbagai penelitian yang bertujuan untuk mengembangkan terapi kanker dan menemukan obat kanker.⁶ Penelitian ini merupakan bagian dari sebuah penelitian yang melakukan eksplorasi daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight. (Walp.)) terhadap pertumbuhan sel kanker, salah satunya sel kanker serviks. Daun Salam telah banyak dimanfaatkan sebagai bahan pelengkap dan penyedap alami pada masakan karena aromanya yang khas. Namun, selain manfaatnya sebagai penyedap

makanan, daun salam ternyata juga menyimpan banyak manfaat lain bagi kesehatan.⁷

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak etanol 96% dalam menghambat pertumbuhan kanker serviks dengan mengamati ekspresi p53 pada sel HeLa. Hasil penelitian diharapkan mampu memberikan informasi mengenai potensi daun salam sebagai antikanker.

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental untuk mengetahui ekspresi p53 pada kanker serviks secara *in vitro* menggunakan metode imunohistokimia.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain inkubator CO₂ (CP 80L KWF), *waterbath* (H-WBE-8L), *rotary evaporator* (Eyela N-1100), timbangan analitik (Ohaus), mikroskop (Olympus CX23), UV-Box (Camag).

Bahan-bahan yang digunakan antara lain sel kanker serviks HeLa yang didapatkan dari Laboratorium Bioassay Departemen Kimia Kedokteran Universitas Indonesia, daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) yang didapatkan dari BALITRO dan telah dilakukan determinasi di Herbarium Bogoriense Bidang Botani (Pusat Penelitian Bogor, LIPI Cibinong), etanol 96% pa (Merck), plat kromatografi lapis tipis (KLT) GF254 (Merck), n-heksan, etil asetat, metanol, kloroform, pereaksi sitroborat, pereaksi Dragendorff, pereaksi vanillin-asam sulfat, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi FeCl₃. Kontrol negatif dalam penelitian ini adalah kultur sel dalam medium komplet tanpa ditambahkan ekstrak etanol 96% daun salam. Cisplatin dari Dankos sebagai kontrol positif, *Phospat Buffer Saline* (PBS) (Sigma), medium kultur Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco), dimetilsulfoksida (DMSO) ACS grade (Biomatik), Anti-p53 antibody [PAb 240] ab26 (Abcam) sebagai antibodi primer, *Mouse PolyVue Plus*^{TM} HRP Detection System dari Diagnostic

BioSystems sebagai antibodi sekunder, 3,3 diamino-benzidine (DAB) dari DAKO, streptavidin (DAKO terkonjugasi HRP), hematoksilin harris (Merck).

Prosedur kerja

Ekstraksi dengan metode maserasi

Tahap ini dilakukan dengan mengikuti prosedur yang dilakukan oleh Hanani dan Hanani dkk dengan modifikasi pada bobot serbuk simplisia yang digunakan. Sebanyak 330 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam maserator, lalu ditambahkan etanol 96% sebanyak 330 ml. dan direndam selama 18 jam. Maserat yang diperoleh dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40-50 °C hingga diperoleh ekstrak kental, kemudian diuapkan pada *waterbath* dengan suhu 40-50 °C menggunakan cawan uap hingga diperoleh ekstrak kering.^{8,9}

Penapisan fitokimia dengan KLT

Identifikasi flavonoid

Pemeriksaan flavonoid dilakukan menggunakan fase n-heksan:etil asetat (4:6) dengan pereaksi semprot sitroborat. Sampel dinyatakan positif mengandung flavonoid jika berwarna kuning kehijauan.¹⁰

Identifikasi steroid/terpenoid

Pemeriksaan steroid dan terpenoid dilakukan menggunakan fase gerak n-heksan:etil asetat (1:9) dengan pereaksi semprot Liebermann-Burchard. Sampel dikatakan positif mengandung steroid jika terbentuk warna biru dan dinyatakan positif mengandung terpenoid jika terbentuk warna merah.^{11,12}

Identifikasi fenol

Pemeriksaan fenol dilakukan menggunakan fase gerak metanol:kloroform (9:1) dengan pereaksi semprot FeCl₃ 5%. Sampel dinyatakan positif mengandung fenolik jika terbentuk warna biru sampai hitam setelah penyemprotan.⁸

Identifikasi alkaloid

Pemeriksaan alkaloid dilakukan menggunakan fase gerak etil

asetat:kloroform (6:4) dengan pereaksi semprot Dragendorff. Sampel dikatakan positif mengandung alkaloid jika terbentuk warna coklat atau jingga.¹¹

Identifikasi saponin

Pemeriksaan saponin dilakukan menggunakan fase gerak kloroform:metanol:air (9:5:1) dan dideteksi dengan pereaksi vanillin-asam sulfat, dan akan memberikan warna biru sampai biru violet pada sinar tampak.¹³

Pengujian ekspresi p53 dengan metode imunohistokimia

Tahap uji imunohistokimia ini dilakukan sesuai dengan prosedur yang dilakukan oleh Hanifah dkk dengan modifikasi pada antibodi primer yang digunakan.¹⁴ Uji aktivitas dilakukan secara triplo terhadap semua perlakuan (kontrol negatif, kontrol positif, dan ekstrak). Sebanyak 1,35 ml sel HeLa ditempatkan ke dalam cawan petri yang sudah memiliki kaca obyek steril kemudian dihomogenkan dengan memutar cawan petri yang membentuk angka 8, dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam. Masing masing ekstrak daun salam (156 µg/ml; 234 µg/ml; dan 312 µg/ml) ditambahkan ke sel dan diinkubasi selama 24 jam. Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur sel dalam medium komplit tanpa ditambahkan ekstrak etanol 96% daun salam. Setelah inkubasi, sel-sel dicuci dengan larutan PBS. Sel-sel kemudian difiksasi dengan meneteskan metanol absolut pada permukaan *object glass* dan didiamkan selama 10 menit. Peroksidase endogen dihentikan aktivitasnya dengan meneteskan larutan hidrogen peroksidase (H₂O₂) 3% ke permukaan *object glass*. *Object glass* tersebut kemudian dicelupkan dalam buffer sitrat 0,01 M (pH 6) dan ditetaskan dengan *prediluting blocking serum*. Selanjutnya sel-sel HeLa pada *object glass* direaksikan dengan antibodi anti-p53 dalam PBS dan diinkubasi semalaman. Setelah inkubasi tersebut, sel-sel direaksikan dengan antibodi sekunder

Mouse PolyVue Plus^{TM} HRP Detection System dan diinkubasi selama 10 menit kemudian diinkubasi selama 3-8 menit pada streptavidin-HRP conjugated. Sel-sel kemudian dilakukan pencucian dengan air suling dan ditambahkan dengan larutan hematoxylin harris.

Pengamatan ekspresi protein p53

Ekspresi protein p53 diamati di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x dan tingkat ekspresi protein diamati dengan menggunakan software ImageJ Profiler Plugin 1.52a version.^{15,16} Data yang diperoleh kemudian dikalkulasi untuk mendapatkan nilai H-score dengan persamaan sebagai berikut :

$$H\text{-score} = (Ax1) + (Bx2) + (Cx3)$$

Keterangan :

A : nilai log low positif

B : nilai log positive

C : nilai log high positive

Arti dari nilai log tersebut adalah Nilai log low positive menunjukkan tingkat ekspresi yang lemah, positive mengindikasikan tingkat ekspresi protein sedang, dan tingkat ekspresi yang tinggi ditunjukkan oleh nilai log high positive.

Analisa data

Data H-score yang diperoleh dari uji imunohistokimia dianalisis menggunakan One-Way ANNOVA pada program IBM SPSS 20 version yang dilanjutkan dengan analisa

Post Hoc menggunakan Duncan test. Signifikansi perbedaan antar perlakuan ditentukan jika nilai $P \leq 0.05$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi serbuk daun salam

Ekstraksi daun salam menghasilkan ekstrak kental sebesar 33,69 gram dengan rendemen 10,21%. Penelitian ini menggunakan metode maserasi untuk mendapatkan ekstrak kental dikarenakan metode ini menggunakan alat yang sangat sederhana dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya yang membutuhkan alat khusus untuk dapat memperoleh ekstrak. Selain itu, metode ini juga sangat mudah dilakukan yaitu hanya dengan merendam serbuk simplisia pada larutan tertentu secara berulang.⁸

Penapisan senyawa metabolit sekunder dengan KLT

Pada penelitian ini kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder daun salam. Ini sesuai dengan peneliti sebelumnya yang menyatakan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu simplisia dapat diketahui melalui pola kromatogram yang terbentuk pada plat KLT.^{8,17} Hasil identifikasi ekstrak etanol 96% daun salam mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, fenol, terpenoid, dan steroid (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol 96% daun salam

Jenis Identifikasi	Pereaksi	Hasil
Flavonoid	Sitroborat	(+)
Alkaloid	Dragendorf	(+)
Saponin	Vanilin Asam Sulfat	(+)
Fenol	FeCl ₃	(+)
Terpenoid	Lieberman-Burchard	(+)
Steroid	Lieberman-Burchard	(+)

Elya dkk dan Ismail dkk juga melaporkan bahwa daun salam mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, seperti senyawa

fenol (pyrogallol, caffeic acid, gallic acid), terpenoid (squalene, azulene, farnesol, α -copaene, α -pinene, α -

panasine, α -humulene, linalool, valencene), asam lemak (asam palmitat, asam stearat), asam lemak ester (metil oleat, metil palmitat), diterpen alkohol (*phytol*), steroid (β -sitosterol).^{7,18}

Efek pemberian ekstrak etanol daun salam terhadap ekspresi p53 pada sel HeLa

Protein p53 merupakan protein yang diekspresikan oleh gen p53 dan telah diketahui memiliki peranan penting dalam pengendalian siklus sel dan kematian sel yang terprogram.¹⁹ Selain itu, p53 juga merupakan regulator utama pada berbagai proses biologis, antara lain autofagi, diferensiasi sel, dan *tumor microenvironment remodeling*.²⁰ Adanya kegagalan ekspresi protein ini akan menyebabkan munculnya

sel-sel yang kehilangan kemampuan untuk melakukan proses kematian sel yang terprogram.

Pada penelitian ini memperlihatkan bahwa sel-sel kanker yang tidak diberi perlakuan masih dapat mengekspresikan protein p53 dengan nilai H-score tertinggi diantara sel-sel kanker yang mendapatkan perlakuan.

Tingkat ekspresi p53 pada sel HeLa setelah pemberian ekstrak etanol 96% daun salam diketahui dengan menggunakan metode imunohistokimia.¹⁴ Metode imunohistokimia yang digunakan yaitu *indirect immunohistochemistry* yang dilakukan dengan menggunakan antibodi yang berbeda dengan fungsi sebagai antibodi primer dan antibodi sekunder.^{21,22}

Gambar 1. Pengamatan ekspresi protein p53 pada sel HeLa pada perbesaran 400x.

Keterangan:

- A. Kontrol Negatif;
- B. Ekstrak etanol 96% daun salam dengan dosis 156,02 $\mu\text{g/ml}$;
- C. Ekstrak etanol 96% daun salam dengan dosis 234,03 $\mu\text{g/ml}$;
- D. Ekstrak etanol 96% daun salam dengan dosis 312 $\mu\text{g/ml}$;
- E. Kontrol Positif

Tabel 2. Hasil Uji One-Way ANOVA

Perlakuan	Rata-rata H-Score $\pm$ SD	Sig.
Kontrol Negatif	292,72 $\pm$ 2,99	
Kontrol Positif (Cisplatin 40 μ g/ml)	136,96 $\pm$ 16,83	
Ekstrak Dosis Rendah (156 μ g/mL)	258,18 $\pm$ 9,11	
Ekstrak Dosis Sedang (234 μ g/mL)	220,22 $\pm$ 13,91	
Ekstrak Dosis Tinggi (312,045 μ g/mL)	151,29 $\pm$ 7,79	0,000

Pada penelitian ini, nilai H-score tertinggi didapatkan pada kontrol negatif (292,72) dan nilai H-score terendah didapatkan pada kontrol positif (136,96) (Tabel 2). Berdasarkan hasil uji *Post Hoc*, pemberian ekstrak dengan ketiga variasi dosis dan kontrol negatif memiliki perbedaan yang signifikan, sedangkan dosis tinggi (312 μ g/ml) dengan nilai H-score sebesar 151,29 tidak berbeda nyata terhadap kontrol positif (H-score: 136,96) (Sig. <0.05). Hal ini memperlihatkan bahwa ekstrak etanol 96% daun salam dengan dosis tinggi dapat menghambat ekspresi protein p53 mutan pada sel kanker serviks HeLa *cell lines*.

Pengembangan terapi pengobatan kanker saat ini ditargetkan untuk dapat melakukan restorasi protein p53. Salah satu cara yang dapat dilakukan untuk restorasi protein p53 adalah dengan melakukan penghambatan kerja inhibitor p53.²³ Ada dua protein yang berperan sebagai inhibitor p53, yaitu *murine double minute 2* (MDM2) pada mencit atau *human double minute 2* (HDM2) pada mausia dan *murine double minute X* (MDMX) atau *human double minute X* (HDMX) pada manusia.^{23,24,25}

Nilai H-score kurang dari 200 setelah pemberian ekstrak etanol 96% dan cisplatin mengindikasikan adanya penghambatan ekspresi protein p53 mutan pada sel kanker HeLa, akan tetapi peran ekstrak tersebut terhadap mekanisme molekuler yang terjadi pada supresi p53 belum diketahui pada penelitian ini.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96% daun salam memiliki potensi untuk dapat dijadikan sebagai agen terapi kanker serviks. Dosis 312

μ g/ml ekstrak etanol 96% daun salam dapat menghambat ekspresi protein p53 mutan pada sel kanker serviks HeLa *cell lines*.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan terkait peran ekstrak etanol 96% daun salam terhadap mekanisme molekuler ekspresi p53 pada sel HeLa untuk memperkuat informasi mengenai potensi ekstrak etanol 96% daun salam sebagai agen antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ervina Dwi Astriani dan Dewi Ayu Mustika Sari yang telah membantu dalam pengumpulan sampel dan pembiakan sel kanker HeLa *cell lines*. Terima kasih juga kepada Kementerian Ristekdikti dalam skema Program Kreativitas Mahasiswa-Penelitian (PKM-P) tahun anggaran 2018/2019 dengan nomor kontrak 215/L3/KM/2019/SPK.

DAFTAR RUJUKAN

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer Journal for Clinicians*. 2018 Nov;68(6):394–424.
2. World Health Organization. Indonesia [Internet]. Vol. 256, International Agency for Research on Cancer. 2019. Available from: <http://gco.iarc.fr/>
3. Cohen PA, Jhingran A, Oaknin A, Denny L. Cervical cancer. *Lancet* [Internet]. 2019;393(10167):169–82. Available from:

- http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32470-X
4. Li S, Hong X, Wei Z, Xie M, Li W, Liu G, et al. Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation. *Frontiers in Microbiology*. 2019 Oct;10(2483):1–11.
5. Sun Z. The General information of the tumor suppressor gene p53 and the protein p53. *Journal of Cancer Prevention & Current Research*. 2015;3(1):1–13.
6. Flores ER. Commentary on “apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents.” *Cancer Research*. 2016;76(23):6763–4.
7. Ismail A, Wan Ahmad WAN. *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp: A potential phytomedicine. *Pharmacognosy Journal*. 2019;11(2):429–38.
8. Hanani E. Analisis Fitokimia. Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2014.
9. Hanani E, Ladeska V, Astuti AC. Pharmacognostical and phytochemical evaluation of Indonesian *Peperomia pellucida* (Piperaceae). *International Journal of Biological & Pharmaceutical Research*. 2017;8(1):10–7.
10. Ahmad AR, Juwita J, Ratulangi SAD. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.SM). *Pharmaceutical Science Research*. 2015;2(1):1–10.
11. Mandal SC, Mandal V, Das AK. Qualitative phytochemical screening. in: *essentials of Botanical Extraction: Principles and Applications*. Academic Press; 2015. p. 173–85.
12. Dwisari F, Harlia, Alimudin AH. Isolasi dan karakterisasi senyawa terpenoid ekstrak metanol akar pohon kayu Buta-butua (*Exoecaria agallocha* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 2016;5(3):25–30.
13. Wardhani LK, Sulistiyani N. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* beserta profil kromatografi lapis tipis. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2012;2(1):1–16.
14. Hanifah RS, Novitarani NA, Harmen F, Tedjo A, Azizah NN, Putrianingsih R, et al. The inhibition of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* stem bark on COX-2 expression of HCT116 colorectal cancer cell line. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2019;12(6):2902.
15. Mane DR, Kale AD, Belaldavar C. Validation of immunoexpression of tenascin-C in oral precancerous and acancerous tissues using ImageJ analysis with novel immunohistochemistry profiler plugin: an immunohistochemical quantitative analysis. *Journal of Oral Maxillofac Pathology*. 2017;21(2):211–7.
16. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014;9(5).
17. Kumar S, Jyotirmayee K, Sarangi M. Thin Layer Chromatography: a tool of biotechnology for isolation of bioactive. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*. 2013;18(1):126–32.
18. Elya B, Handayani R, Sauriasari R, Azizahwati, Hasyiyati US, Permana IT, et al. Antidiabetic activity and phytochemical screening of extracts from Indonesian plants by inhibition of alpha amylase, alpha glucosidase and dipeptidyl peptidase IV. *Pakistan Journal Biological Sciences*. 2015;18(6):273–8.
19. Cao X, Hou J, An Q, Assaraf YG, Wang X. Towards the overcoming of anticancer drug resistance mediated by p53 mutations. *Drug Resistance Updates*. [Internet]. 2020;49(100671). Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368764619300688>
20. Napoli M, Flores ER. The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: physiological regulation and implications for cancer therapy. *British Journal of Cancer*. [Internet]. 2017;116(2):149–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2016.384>
21. Taylor C, Shi S-R, Barr NJ. Techniques of Immunohistochemistry: principles, pitfalls, and standardization. in: Dabbs D, editor. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. Third Edit. Saunders Elsevier; 2010.
22. Ziaieian B, Nourse JL, Palmer T, Schwartz PH, Flanagan LA. Immunocytochemical analysis of human

- stem cells. in: Peterson S, Loring J, editors. Human Stem Cell Manual: A Laboratory Guide [Internet]. Second Edi. Academic Press; 2012. p. 249–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385473-5.00016-3>
23. Sanz G, Singh M, Peugeot S, Selivanova G. Inhibition of p53 inhibitors: progress, challenges and perspectives. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2019;11(7):586–99.
24. Pei D, Zhang Y, Zheng J. Regulation of p53: a collaboration between MDM2 and MDMX. *Oncotarget*. 2012;3(3):228–35.
25. Karni-Schmidt O, Lokshin M, Prives C. The Roles of MDM2 and MDMX in cancer. *Annual Review of Pathology*. 2017;11:617–64.