



**PEWARNAAN α -ACTININ SEBAGAI METODE
PENGUKURAN LUAS PERMUKAAN SEL MODEL
KARDIOMIOBLAS (H9C2) YANG DIINDUKSI
DENGAN ANGIOTENSIN II**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh

ARIEF MAOELANA RACHMAN

21701101082

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG
2021**



**PEWARNAAN α -ACTININ SEBAGAI METODE
PENGUKURAN LUAS PERMUKAAN SEL MODEL
KARDIOMIOBLAS (H9C2) YANG DIINDUKSI
DENGAN ANGIOTENSIN II**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

ARIEF MAOELANA RACHMAN

21701101082

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG
2021**



**PEWARNAAN α -ACTININ SEBAGAI METODE
PENGUKURAN LUAS PERMUKAAN SEL MODEL
KARDIOMIOBLAS (H9C2) YANG DIINDUKSI
DENGAN ANGIOTENSIN II**

SKRIPSI

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh

ARIEF MAOELANA RACHMAN

21701101082

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM MALANG
2021**

RINGKASAN

Arief Maoelana R, Prodi Sarjana Kedokteran, Universitas Islam Malang, 21 Juni 2021. Pewarnaan α -Actinin Sebagai Metode Pengukuran Luas Permukaan Sel Model Kardiomioblas (H9C2) Yang Diinduksi Dengan Angiotensin II
Pembimbing 1: Rahma Triliana, **Pembimbing 2 :** Rio Risandiansyah.

Pendahuluan: Hipertrofi kardiomioblas sebagai karakteristik gagal jantung dapat direplikasi secara in vitro menggunakan sel H9C2 yang diinduksi dengan Angiotensin II (Ang-II). Namun pengukuran luas sel sulit dilakukan apabila tanpa pewarnaan khusus. Penelitian ini dilakukan untuk menilai luas permukaan sel dengan dan tanpa pewarnaan α -Actinin pada sel model kardiomioblas H9C2 yang diinduksi dengan Ang II.

Metode: Sel H9C2 ditumbuhkan pada media Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) dan disubkulturasi setiap 2-3 hari sampai kepadatan populasi sel 80% sebelum dipindahkan ke T-25 flasks. Sel kemudian diinkubasi dengan 600nM Ang II selama 24 jam. Pewarnaan α -actinin dilakukan dengan 4% paraformaldehyde, 0.5% Triton X-100, antibodi primer dan sekunder. Kultur yang telah diwarnai kemudian diobservasi menggunakan mikroskop dan diukur luas permukaannya menggunakan Image-J. Hasil dianalisa dengan uji T-test dan $p < 0.05$ dianggap signifikan.

Hasil: Sel H9C2 tanpa pewarnaan α -actinin tidak menunjukkan perbedaan signifikan pada penghitungan luas permukaan sel pasca induksi Ang-II dibanding kontrol ($3 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$). Pewarnaan α -actinin membantu visualisasi sel H9C2 oleh adanya fluoresensi hijau sehingga memperbaiki akurasi pengukuran luas permukaan sel H9C2 yang diinduksi dengan Ang II. Hal ini ditunjukkan oleh perbedaan yang signifikan antara kontrol vs induksi Ang II ($4 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$ vs $9 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$) pasca pewarnaan α -actinin.

Kesimpulan: Pemberian angiotensin II dapat menyebabkan kondisi hipertrofi kardiomioblas dan pewarnaan α -actinin dapat membantu akurasi evaluasi pengukuran luas sel model kardiomioblas (H9C2).

Kata Kunci : *Cardiomyoblast hypertrophy; H9C2; Angiotensin II; α -Actinin Staining.*

SUMMARY

Arief Maelana R, Faculty of Medicine, Islamic University Malang June, 21 2021.
 α -Actinin Staining for Measurement of Cell Surface Area in H9C2 Cells Induced with Angiotensin II.

Superviror 1: Rahma Triliana, **Supervisor 2 :** Rio Risandiansyah.

Introduction: Cardiomyoblast hypertrophy as a characteristic of heart failure can be replicated in in vitro studies using H9C2 cells induced with Angiotensin II (Ang II). However, Measurement of cell area is difficult to do without particular staining. The study was conducted to assess the surface area of cells with and without α -Actinin staining in H9C2 cardiomyoblast model cells induced with Ang II.

Method: The H9C2 cells grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) are passaged every 2-3 days when the cell population density reaches 80% before being transferred to T-25 flasks. The cell is then incubated with 600 nM Ang II for 24 hours. α -Actinin staining was performed with 4% paraformaldehyde, 0.5% Triton X-100, primary and secondary antibodies. The cells then observed using a microscope and measurement of cell surface area quantitated using Image-J software. Results analyzed with the T-test and $p < 0.05$ are considered significant.

Results: There is no significant difference between H9C2 cells exposed with Ang-II compared to control ($3 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$) without α -actinin staining. α -Actinin staining improved visualization characterized by the presence of green fluorescence thus improving the accuracy of measurement of the surface area of H9C2 cells induced with Ang II. This is indicated by a significant difference between control vs Ang II induction ($4 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$ vs $9 \times 10^{-9} \mu\text{m} \pm \text{SD}$) post α -actinin staining.

Conclusion: Exposure of Ang II can cause hypertrophic conditions and α -actinin staining improved the accuracy of evaluation in measurement of cardiomyoblast model cells (H9C2).

Keywords: *Cardiomyoblast hypertrophy; H9C2; Angiotensin II; α -Actinin Staining.*

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Metode pewarnaan α -actinin adalah salah satu pewarnaan yang dapat diaplikasikan pada penelitian yang melibatkan fitur hipertrofi sel, salah satunya adalah sel H9C2 yang diambil dari ventrikel tikus. Metode pewarnaan α -actinin merupakan yang paling sering digunakan karena dapat membantu visualisasi sel dengan karakteristiknya yang memberikan fluoresensi hijau (Watkins *et al.*, 2011). α -actinin yang merupakan filamen yang menyusun sitoskeleton menjadi alasan kuat pewarnaan pada aktin adalah yang paling baik dibandingkan pewarnaan lain yang pernah diaplikasikan terhadap sel. Kelebihan dari pewarnaan α -actinin terletak pada antibodi (anti- α -actinin) yang digunakan dimana antibodi ini memberi warna pada garis *Z myofibril* di jantung sehingga dapat membantu proses deteksi dan visualisasi sel yang baik (Morris *et al.*, 2020). Sehubungan dengan banyaknya kasus hipertrofi jantung dan resiko kematian karena masalah Kesehatan ini, diperlukan metode yang lebih peka dari metode yang sudah ada selama ini sehingga kelainan ini bisa terdeteksi lebih awal (Riskesdas, 2013).

Hipertrofi sel adalah marker atau kondisi awal dari gagal jantung (Bernardo dan McMullen, 2016) yang mana kondisi ini disebabkan oleh rangsangan patologis yang menyebabkan *remodeling* jantung sehingga sel akan hipertrofi dan pada akhirnya akan menyebabkan gagal jantung (Wang *et al.*, 2016). Angiotensin II (Ang II) adalah stimulus yang kuat dan menjadi faktor yang merangsang pertumbuhan atau proliferasi miosit jantung dimana Ang II ditemukan meningkat

pada pasien gagal jantung (Zucker *et al.*, 2015). Ang II dapat digunakan untuk meniru hipertrofi jantung yang diinduksi oleh hipertensi (Ying *et al.*, 2014) dan telah banyak digunakan sebagai stimulus hipertrofik dalam berbagai model penyakit jantung pada studi *in vitro* (Ding *et al.*, 2019).

Aktivasi sistem *neurohormonal* terlibat dalam proses hipertrofi sel, dengan angiotensin II (Ang II) menjadi kunci dalam menginduksi hipertrofi sel kardiomyosit. Kardiomyosit merespons Ang II dengan memulai beberapa kaskade yang menyebabkan hipertrofi (Zhou *et al.*, 2016). Menyatunya Ang II pada reseptor angiotensin tipe 1 (AT1R) dan *G-protein-coupled receptor* (GPCRs), menyebabkan disosiasi dari *G-protein* jenis lain yang mengaktifkan beberapa kinase pensinyalan dan fosfatase salah satunya *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) (Zhou *et al.*, 2016). MAPK adalah sekelompok protein kinase serin dan treonin yang dikodekan oleh banyak gen. *Extracellular signal-related kinases* (ERK1/2), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK1/2), dan p38 kinase (p38) adalah tiga MAPK yang telah dilaporkan terlibat dalam proliferasi hipertrofi sel kardiomyosit (Gallo *et al.*, 2019).

Penelitian *in vitro* mengenai hipertrofi sel kardiomyosit telah banyak digunakan untuk menyelidiki mekanisme patogenesis dari gagal jantung, yang dapat diinduksi oleh berbagai rangsangan seperti angiotensin II (Ang II) (Chiang *et al.*, 2018). Angiotensin II sendiri adalah agen rangsangan hipertrofik yang cukup baik dan dapat meniru hipertrofi jantung yang disebabkan oleh tekanan darah tinggi dalam kondisi hipertensi dengan manifestasi awalnya adalah hipertrofi sel kardiomyosit (Ying *et al.*, 2014). Gambaran hipertrofi sel kardiomyosit pada sel dapat dinilai dengan melihat adanya peningkatan ukuran permukaan sel (Dong *et*

al., 2018). Namun, pengukuran luas permukaan sel pada penelitian *in vitro* tidak dapat dilakukan tanpa pewarnaan khusus (Siti *et al.*, 2021).

Hipertrofi pada sel dapat dinilai dengan melihat peningkatan ukuran area permukaan dan *BNP level* pada sel model kardiomioblas atau kardiomiosit yang pada penelitian hipertrofi terhalang oleh visualisasi sel sehingga diperlukan pewarnaan khusus yang dapat membantu pengukuran luas permukaan sel. Ada banyak metode untuk menilai luas area permukaan kardiomioblas atau kardiomiosit seperti pewarnaan α -actinin (Jeong *et al.*, 2015) yang memberikan fluoresensi hijau pada sel sehingga visualisasi sel akan lebih baik. Namun, metode tersebut belum banyak digunakan dalam penelitian terhadap sel kardiomioblas dengan penggunaan Angiotensin II untuk induksi hipertrofi pada sel H9C2. Sel H9C2 merupakan sel model kardiomioblas yang diambil dari jaringan embrionik ventrikel tikus. Sel H9C2 yang memiliki kemiripan yang cukup baik menduplikasi sel kardiomiosit pada ventrikel manusia menjadi alasan penggunaan sel ini (Watkins *et al.*, 2011). Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan induksi hipertrofi menggunakan Angiotensin II dan pengukuran area permukaan sel dilakukan dengan menggunakan pewarnaan α -actinin dengan prinsip kerja ELISA sederhana yang dapat membantu visualisasi pengukuran luas permukaan sel H9C2.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Apakah efek pewarnaan α -actinin terhadap pengukuran hipertrofi sel kardiomioblas pada sel H9C2 yang diinduksi Angiotensin II ?

1.2.2 Apakah efek induksi Angiotensin II terhadap parameter ukuran permukaan sel kardiomioblas pada sel H9C2 ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan antara lain :

1.3.1 Untuk mengetahui efek pewarnaan α -actinin terhadap hipertrofi sel kardiomioblas pada sel H9C2 yang diinduksi Angiotensin II.

1.3.2 Untuk mengetahui efek induksi Angiotensin II terhadap parameter ukuran permukaan sel kardiomioblas pada sel H9C2

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Praktis

Bagi Masyarakat : Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi secara ilmiah mengenai efek induksi Angiotensin II terhadap parameter ukuran permukaan sel kardiomioblas yang dilihat melalui pewarnaan α -actinin.

1.4.2 Manfaat Teoritis

Bagi peneliti : Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai referensi pengembangan penelitian tentang efek induksi Angiotensin II terhadap parameter ukuran permukaan sel kardiomioblas pada sel H9C2, dan proses pewarnaan α -actinin terhadap parameter ukuran permukaan sel kardiomioblas pada sel H9C2 yang diinduksi Angiotensin II.

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Hasil dari penelitian dan pembahasan ini dapat disimpulkan bahwa

1. Paparan Ang II dapat menyebabkan kondisi hipertrofik pada sel model kardiomioblas, Namun kondisi tersebut tidak dapat diukur tanpa dilakukan pewarnaan.
2. Evaluasi fitur hipertofi sel dapat dilakukan dengan pewarnaan α -actinin.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, peneliti menyarankan untuk

1. Melakukan penelitian lebih lanjut mengenai hipertrofi kardiomioblas dengan parameter yang lebih beragam.
2. Melakukan penelitian serupa dengan kontrol positif yang berbeda menggunakan pewarnaan α -actinin.
3. Melakukan penelitian serupa dengan penambahan perlakuan untuk menguji ekstrak etanol tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005) 'Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 289(1 58-1), pp. 8–16. doi: 10.1152/ajpheart.01303.2004.
- Bernardo, B. C. and McMullen, J. R. (2016) 'Molecular Aspects of Exercise-induced Cardiac Remodeling', *Cardiology Clinics*, 34(4), pp. 515–530. doi: 10.1016/j.ccl.2016.06.002.
- Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L., & McMullen, J. R. (2010) 'Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies', *Pharmacology and Therapeutics*, 128(1), pp. 191–227. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.04.005.
- Bers, D. M., Eisner, D. A. and Valdivia, H. H. (2003) 'Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ and heart failure roles of diastolic leak and Ca²⁺ transport', *Circulation Research*, 93(6), pp. 487–490. doi: 10.1161/01.RES.0000091871.54907.6B.
- Brittsan, A. G., Carr, A. N., Schmidt, A. G., & Kranias, E. G. (2000) 'Maximal inhibition of SERCA2 Ca²⁺ affinity by phospholamban in transgenic hearts overexpressing a non-phosphorylatable form of phospholamban', *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), pp. 12129–12135. doi: 10.1074/jbc.275.16.12129.
- Chiang, J. T., Badrealam, K. F., Shibu, M. A., Kuo, C. H., Huang, C. Y., Chen, B. C., Huang, C. Y. (2018) 'Eriobotrya japonica ameliorates cardiac hypertrophy in H9c2 cardiomyoblast and in spontaneously hypertensive rats', *Environmental Toxicology*, 33(11), pp. 1113–1122. doi: 10.1002/tox.22589.
- De Simone, G. (2003) 'Left ventricular geometry and hypotension in end-stage renal disease: A mechanical perspective', *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(10), pp. 2421–2427. doi: 10.1097/01.ASN.0000088724.66957.FC.
- Ding, J., Tang, Q., Luo, B., Zhang, L., Lin, L., Han, L., et al. (2019). Klotho Inhibits Angiotensin II-Induced Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Dysfunction in Mice through Suppression of Transforming Growth Factor-B1 Signaling Pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 859, 172549. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172549
- Dong, B., Liu, C., Xue, R., Wang, Y., Sun, Y., Liang, Z., Huang, H. (2018) 'Fisetin inhibits cardiac hypertrophy by suppressing oxidative stress', *Journal of Nutritional Biochemistry*, 62, pp. 221–229. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.08.010.

- Eroschenko, V. P. and Fiore, V. (2013) *Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations 12 ed.* Lippincott Williams & Wilkins.
- Frey, N. and Olson, E. N. (2003) 'Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly', *Annual Review of Physiology*, 65, pp. 45–79. doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243.
- Gallo, S., Vitacolonna, A., Bonzano, A., Comoglio, P., & Crepaldi, T. (2019). ERK: A Key Player in the Pathophysiology of Cardiac Hypertrophy. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2164. <https://doi.org/10.3390/ijms20092164>
- Gheorghide M, Filippatos GS, Felker GM. (2012) Diagnosis and management of acute heart failure syndromes. In: braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 9 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 27.p.517-42.
- Ghonim, S., Voges, I., Gatehouse, P. D., Keegan, J., Gatzoulis, M. A., Kilner, P. J., & Babu-Narayan, S. V. (2017) 'Myocardial Architecture, Mechanics, and Fibrosis in Congenital Heart Disease', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4(May), pp. 1–15. doi: 10.3389/fcvm.2017.00030.
- Gui, J. S., Jalil, J., Jubri, Z., & Kamisah, Y. (2019) 'Parkia speciosa empty pod extract exerts anti-inflammatory properties by modulating NFκB and MAPK pathways in cardiomyocytes exposed to tumor necrosis factor-α', *Cytotechnology*, 71(1), pp. 79–89. doi: 10.1007/s10616-018-0267-8.
- Heineke, J. and Molkenin, J. D. (2006) 'Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), pp. 589–600. doi: 10.1038/nrm1983.
- Hilgemann, D. W. (2004) 'New insights into the molecular and cellular workings of the cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(5 56-5). doi: 10.1152/ajpcell.00288.2004.
- Hulme, J. T., Lin, T. W., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., & Catterall, W. A.. (2003) '-Adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac Ca', *Molecular Biology*, 100(22), pp. 13093–13098.
- Hussain, M. and Awan, F. R. (2018) 'Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease', *Clinical and Experimental Hypertension*, 40(4), pp. 344–352. doi: 10.1080/10641963.2017.1377218.
- Ichinoseki-Sekine, N., Yoshihara, T., Kakigi, R., Ogura, Y., Sugiura, T., & Naito, H. (2012) 'Fiber-type specific expression of α-actinin isoforms in rat skeletal muscle', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419(2), pp. 401–404. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.02.034.
- Jamhiri, M., Dahaj, F. S., Astani, A., Hejazian, S. H., Hafizibarjin, Z., Ghobadi, M., Safari, F. (2019) 'Carvacrol ameliorates pathological cardiac hypertrophy in both in-vivo and in-vitro models', *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 18(3), pp. 1380–1394. doi: 10.22037/ijpr.2019.1100766.

- Jeong, M. H., Kim, S., Kang, H., Park, K. W., & Park, W. J. (2015) 'Cucurbitacin I Attenuates Cardiomyocyte Hypertrophy via Inhibition of Connective Tissue Growth Factor (CCN2) and TGF- β / Smads Signalings', *PLoS One*, 10(8), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0136236.
- Kang, Y. (2006) 'Cardiac hypertrophy: A risk factor for QT-prolongation and cardiac sudden death', *Toxicologic Pathology*, 34(1), pp. 58–66. doi: 10.1080/01926230500419421.
- Kass, D. A., Saavedra, W. F. and Sabbah, H. N. (2004) 'Reverse remodeling and enhanced inotropic reserve from the cardiac support device in experimental cardiac failure.', *Journal of cardiac failure*, 10(6 Suppl), pp. 215–219. doi: 10.1016/j.cardfail.2004.09.003.
- Kemendes RI. (2014) Hipertensi. **Infodatin Pusat Data dan Informasi Kementerian kesehatan RI** ; (Hipertensi):1-7.
- Li, J., Robertson, D. R. and Lemanski, L. F. (1994) 'Morphometric analysis of cultured normal and cardiomyopathic hamster heart cells after immunofluorescent staining for tubulin and α -actinin', *Acta Histochemica*, 96(1), pp. 33–42. doi: 10.1016/S0065-1281(11)80006-1.
- Limana, F., Capogrossi, M. C. and Germani, A. (2011) 'The epicardium in cardiac repair: From the stem cell view', *Pharmacology and Therapeutics*, 129(1), pp. 82–96. doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.09.002.
- Louch, W. E., Sheehan, K. A. and Wolska, B. M. (2011) 'Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(3), pp. 288–298. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.06.012.
- Morris, T.A., Naik, J., Fibben, K.S., *et al.* (2020) 'Striated myocyte structural integrity: Automated analysis of sarcomeric z-disks', *PLoS Comput Biol*, 16(3):e1007676. doi:10.1371/journal.pcbi.1007676
- Mustafa, N., Ugusman, A., Jalil, J., & Kamisah, Y. (2018) 'Anti-inflammatory property of Parkia speciosa empty pod extract in human umbilical vein endothelial cells', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(01), pp. 152–158. doi: 10.7324/JAPS.2018.8123.
- Nadila, F. (2014) 'ANTIHYPERTENSIVE POTENTIAL OF CHAYOTE FRUIT EXTRACT Kandungan labu siam Potensi flavonoid', *J MAJORITY*, 3, pp. 34–38.
- Ogura, Y., Naito, H., Kakigi, R., Ichinoseki-Sekine, N., Kurosaka, M., & Katamoto, S. (2008) 'Alpha-actinin-3 levels increase concomitantly with fast fibers in rat soleus muscle', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 372(4), pp. 584–588. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.059.
- Ogura, Y., Naito, H., Kakigi, R., Akema, T., Sugiura, T., Katamoto, S., & Aoki, J. (2009) 'Different adaptations of alpha-actinin isoforms to exercise training

- in rat skeletal muscles', *Acta Physiologica*, 196(3), pp. 341–349. doi: 10.1111/j.1748-1716.2008.01945.x.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*. 2016;37(29):2315-2381. doi:10.1093/eurheartj/ehw106
- Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Davies, C. (2016) '2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure', *European Heart Journal*, 37(27), pp. 2129-2200m. doi: 10.1093/eurheartj/ehw128.
- Prathapan, A., Vineetha, V. P., Abhilash, P. A., & Raghun, K. G. (2013) 'Boerhaavia diffusa L . attenuates angiotensin II-induced hypertrophy in H9c2 cardiac myoblast cells via modulating oxidative stress and down-regulating NF-kb and transforming growth factor b 1 British Journal of Nutrition', *British Journal of Nutrition*, 110, pp. 1201–1210. doi: 10.1017/S0007114513000561.
- Reiken, S., Wehrens, X. H. T., Vest, J. A., Barbone, A., Klotz, S., Mancini, D., ... Marks, A. R. (2003) 'B-Blockers Restore Calcium Release Channel Function and Improve Cardiac Muscle Performance in Human Heart Failure', *Circulation*, 107(19), pp. 2459–2466. doi: 10.1161/01.CIR.0000068316.53218.49.
- Riley, P. R. (2012) *An Epicardial Floor Plan for Building and Rebuilding the Mammalian Heart, Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-387786-4.00007-5.
- Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). (2013). **Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI tahun 2013**. Diakses: 24 September 2021, dari <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf>.
- Shimizu, I. and Minamino, T. (2016) 'Physiological and pathological cardiac hypertrophy', *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 97, pp. 245–262. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.06.001.
- Simpson, P., McGrath, A. and Savion, S. (1982) 'Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines', *Circulation Research*, 51(6), pp. 787–801. doi: 10.1161/01.RES.51.6.787.
- Siti, H. N., Jalil, J., Asmadi, A. Y., and Kamisah, Y. (2021). Rutin Modulates MAPK Pathway Differently from Quercetin in Angiotensin II-Induced H9c2 Cardiomyocyte Hypertrophy. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (10), 5063. doi:10.3390/ijms22105063

- Subedi, K.P., Son, M.J., Chidipi, B., Kim, S.W., Wang, J., Kim, K.H., Woo, S.H., Kim, J.C. (2017) 'Signaling Pathway for Endothelin-1- and Phenylephrine-Induced cAMP Response Element Binding Protein Activation in Rat Ventricular Myocytes: Role of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors and CaMKII', *Cell Physiol Biochem*, 41(1):399-412. doi:10.1159/000456422.
- Tang, L., Yu, X., Zheng, Y., & Zhou, N. (2020) 'Inhibiting SLC26A4 reverses cardiac hypertrophy in H9C2 cells and in rats', *PeerJ*, 2020(1), pp. 1–20. doi: 10.7717/peerj.8253.
- Taubman, M. B. (2003) 'Angiotensin II: A vasoactive hormone with ever-increasing biological roles', *Circulation Research*, 92(1), pp. 9–11. doi: 10.1161/01.RES.0000052920.70316.AE.
- Te Riet, L., Van Esch, J. H. M., Roks, A. J. M., Van Den Meiracker, A. H., & Danser, A. H. J. (2015) 'Hypertension: Renin-Angiotensin-Aldosterone System Alterations', *Circulation Research*, 116(6), pp. 960–975. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.303587.
- Tham, Y. K., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Weeks, K. L., & McMullen, J. R. (2015) 'Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets', *Archives of Toxicology*, 89(9), pp. 1401–1438. doi: 10.1007/s00204-015-1477-x.
- Vidyasekar, P., Shyamsunder, P., Santhakumar, R., Arun, R., & Verma, R. S. (2015) 'A simplified protocol for the isolation and culture of cardiomyocytes and progenitor cells from neonatal mouse ventricles', *European Journal of Cell Biology*, 94(10), pp. 444–452. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.06.009.
- Wang, J., Hu, X. and Jiang, H. (2016) 'HDAC inhibition: A novel therapeutic approach for attenuating heart failure by suppressing cardiac remodeling', *International Journal of Cardiology*, 214(20110141120060), pp. 41–42. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.188.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M., Oakenfull, R., Robson, A., & Arthur, H. M. (2012) 'Angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy in vitro is TAK1-dependent and Smad2/3-independent', *Hypertension Research*, 35(4), pp. 393–398. doi: 10.1038/hr.2011.196.
- Watkins, S. J., Borthwick, G. M. and Arthur, H. M. (2011) 'The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro', *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 47(2), pp. 125–131. doi: 10.1007/s11626-010-9368-1.
- Weeks, K. L., Bernardo, B. C., Ooi, J. Y. Y., Patterson, N. L., & McMullen, J. R. (2017) 'The IGF1-PI3K-Akt signaling pathway in mediating exercise-induced cardiac hypertrophy and protection', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1000, pp. 187–210. doi: 10.1007/978-981-10-4304-8_12.

- Weng, C.L., Zhao, Y.T., Liu, Q.H., Fu, C.J., Sun, F., Ma, Y.L., et al. (2010) 'Meta-analysis: noninvasive ventilation in acute cardiogenic pulmonary edema', *Ann Intern Med*;152: 590-600.
- Witek, P., Korga, A., Burdan, F., Ostrowska, M., Nosowska, B., Iwan, M., Dudka, J. (2016) 'The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results', *Cytotechnology*, 68(6):2407-2415. doi:10.1007/s10616-016-9957-2.
- Whitaker, R. H. (2010) 'Anatomy of the heart', *Medicine*, 38(7), pp. 333–335. doi: 10.1016/j.mpmed.2010.04.005.
- Williams, D. A., Delbridge, L. M., Cody, S. H., Harris, P. J., & Morgan, T. O. (1992) 'Spontaneous and propagated calcium release in isolated cardiac myocytes viewed by confocal microscopy', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 262(3 31-3). doi: 10.1152/ajpcell.1992.262.3.c731.
- Ying, H., Xu, M. C., Tan, J. H., Shen, J. H., Wang, H., & Zhang, D. F. (2014) 'Pressure Overload-Induced cardiac hypertrophy response requires janus kinase 2-Histone deacetylase 2 signaling', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), pp. 20240–20253. doi: 10.3390/ijms151120240.
- Zain, M. and Awan, F. R. (2014) 'Renin Angiotensin Aldosterone System (RAAS): Its biology and drug targets for treating diabetic nephropathy', *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5), pp. 1379–1391.
- Zhang, D., Gaussin, V., Taffet, G. E., Belaguli, N. S., Yamada, M., Schwartz, R. J., ... Schneider, M. D. (2000) 'TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice', *Nature Medicine*, 6(5), pp. 556–563. doi: 10.1038/75037.
- Zhang, H., Lui, K. O. and Zhou, B. (2018) 'Endocardial cell plasticity in cardiac development, diseases and regeneration', *Circulation Research*, 122(5), pp. 774–789. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312136.
- Zhou, L., Ma, B., & Han, X. (2016). The role of autophagy in angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular endocrinology*, 57(4), R143–R152. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0086>
- Zucker, I. H., Schultz, H. D., Patel, K. P., and Wang, H. (2015). Modulation of Angiotensin II Signaling Following Exercise Training in Heart Failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 308 (8), H781–H791. doi:10.1152/ajpheart.00026.2015