

## KORELASI EKSPRESI PROTEIN CYTOGLOBIN MELALUI UJI IMMUNORATIO DENGAN PERTUMBUHAN JARINGAN EPITEL DAN DERMIS PADA PERTUMBUHAN JARINGAN EKOR CECAK (*Hemidactylus platyurus*)

Titta Novianti<sup>1,2</sup>, Vetrizah Juniantito<sup>3</sup>, Ahmad Aulia Jusuf<sup>4</sup>, Evy Ayu Arida<sup>5</sup>, Mohamad Sadikin<sup>6</sup>, Sri Widia A. Jusman

<sup>1</sup>Doctoral Biomedical Program, Faculty of Medicine University of Indonesia

<sup>2</sup>Biotechnology Department, Esa Unggul University, Indonesia

<sup>3</sup>Department of Pathology, Faculty of Animal Health, Agriculture Institute of Bogor, Indonesia

<sup>4</sup>Department of Histology Faculty of Medicine University of Indonesia

<sup>5</sup>Institute of Indonesia Science (LIPI) Cibinong Bogor Indonesia

<sup>6</sup>Central of Hypoxia, Biochemistry Department Faculty of Medicine University of Indonesia

[titta@esaunggul.ac.id](mailto:titta@esaunggul.ac.id)

### Abstract

The oxygen need is very important in tissue regeneration process for the sustainability of metabolic process. The high activity of cells and tissues during regeneration requires high energy therefore oxygen demand is very high. Cytoglobin (Cygb) is a protein that plays a role to diffuse oxygen to mitochondria. Cygb is a molecule that has a high affinity to oxygen and expressed during hypoxic conditions, when the tissue lacks oxygen. The tissue in regeneration process experiences at hypoxia state, Cygb protein expression have an important role during the tissue regeneration process. The Spearman correlation test results the strong correlation between the expression of Cygb protein of immunoratio test in immunohistochemical staining with the growth of epidermal thickness of tissue ( $r = 0.67$ ;  $p < 0.05$ ). The results of correlation test between Cygb protein expression with the growth of dermis thickness showed moderate correlation properties ( $r = 0.406$ ;  $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Cygb, oxygen, tissue regeneration, house gecko, immunoratio

### Abstrak

Pada proses regenerasi jaringan kebutuhan akan oksigen sangat penting bagi keberlangsungan proses metabolisme. Tingginya aktivitas sel dan jaringan saat regenerasi memerlukan energi yang tinggi sehingga kebutuhan oksigen sangat tinggi. Protein Cytoglobin (Cygb) merupakan protein yang berperan mendifusikan oksigen ke dalam mitokondria. Cygb merupakan molekul yang memiliki daya afinitas tinggi terhadap oksigen dan diekspresikan pada saat keadaan hipoksia, pada saat jaringan kekurangan oksigen. Proses regenerasi jaringan mengalami keadaan hipoksia dan diekspresikan protein Cygb yang diduga memiliki peran penting pada proses regenerasi jaringan. Hasil uji korelasi menunjukkan adanya korelasi kuat antara ekspresi protein Cygb pada uji immunoratio dari pewarnaan imunohistokimia dengan pertumbuhan ketebalan epidermis dengan uji Spearman ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,05$ ). Hasil uji korelasi dengan pertumbuhan ketebalan dermis menunjukkan sifat korelasi sedang ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,05$ ).

**Key words:** Cygb, oksigen, regenerasi jaringan, cecak, immunoratio

### Pendahuluan

Regenerasi jaringan sangat penting bagi makhluk hidup, terutama pada saat mengalami kerusakan jaringan atau organ (Fausto *et al*, 2006; Reinke & Sog, 2012). Proses regenerasi diharapkan mampu memperbaiki jaringan atau organ yang mengalami kerusakan, sehingga dapat beraktivitas kembali dan menjalankan fungsi seperti semula (Mescher, 2017; Kraft, 2010).

Proses regenerasi jaringan akibat luka akan mengalami peristiwa penyembuhan luka, yang meliputi tahap inflamasi, tahap granulasi, dan tahap

kontraksi luka (Mescher, 2017; Kraft, 2010; Mason & Dunnill, 2008). Setelah jaringan mengalami cedera, maka jaringan akan mengalami inflamasi. Pada tahap inflamasi belum terjadi proses regenerasi jaringan, hanya terjadi proses penghentian aliran darah ke area cedera dengan membentuk gumpalan yang dipadatkan membentuk serat fibrin. Penggumpalan darah ini memerlukan faktor penggumpalan darah dan trombosit (Theise & Busell, 2007; Alibardi, 2010).

Pada tahap inflamasi juga terjadi migrasi sel neutrofil dan makrofag, memfagositosis sel mati,

serta membunuh bakteri di area cedera (Allibardi, 2010; Meschner, 2011). Sintesis kolagen sangat penting dalam proses re-epitelisasi dan pembentukan pembuluh kapiler baru atau angiogenesis (Theise & Busell, 2007). Sel epitel memulai proses perbaikan dari mulai lapisan basal lamina ke area luka. Sel epitel akan membentuk lapisan epitel tipis pertama secara terus menerus untuk menutupi area luka sehingga terbentuk jaringan epitel baru (Meschner, 2011; Lozito & Tuan, 2015). Pembentukan epitel baru akan menutup luka. Setelah luka tertutup, semua jaringan yang terdapat di bagian dalam epidermis penutup luka, yaitu jaringan otot, tulang, tulang rawan, dan jaringan ikat mengalami disintegrasi serta kehilangan ciri karakteristiknya. Pada tahap ini semua jaringan mengalami dediferensiasi (Theise and Busell, 2007; Meschner, 2011).

Keseluruhan proses dalam regenerasi jaringan ini memerlukan oksigen yang banyak, maka diperlukan protein yang mampu mendifusikan oksigen ke dalam mitokondria. Pengetahuan tentang peranan protein Cygb terhadap regenerasi jaringan masih sangat terbatas (Sha, 2011). Beberapa hasil penelitian, menyimpulkan dugaan beberapa peranan Cygb dalam jaringan pada keadaan hipoksia, antara lain berperan dalam difusi oksigen ke dalam rantai pernafasan mitokondria dan sebagai penyimpan oksigen sesuai hasil penelitian Nakatani (2007) yang menunjukkan adanya Cygb pada fibrosis jaringan ketika persediaan oksigen berkurang. Fungsi lainnya adalah sebagai sensor oksigen, Cygb dapat meregulasi aktivitas protein yang mampu merespon perubahan kadar oksigen dalam jaringan (Oleksiewicz, 2013).

Pada penelitian kali ini dilakukan analisis korelasi ekspresi protein Cytoglobin pada pewarnaan imunohistokimia dengan pertumbuhan ketebalan epidermis dan dermis pada proses regenerasi jaringan.

## Metode Penelitian

Sampel penelitian adalah jaringan ekor hasil pertumbuhan regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*) (Gambar 1) yang telah dipelihara dan beradaptasi di kandang Herpetologi Laboratorium Zoologi Puslitbang Biologi LIPI - Cibinong. Cecak yang dipilih cecak betina dan jantan dewasa dari spesies *Hemidactylus platyurus* yang belum mengalami autotomi dalam keadaan hidup dengan berat rata-rata 5 gram dan panjang tubuh 10-13 cm. Cecak ditangkap dengan cara meregangkan karet gelang dengan jari dan ditembakkan ke arah cecak, saat jatuh cecak ditangkap dan disimpan dalam plastik yang

berlubang. Ijin etik penelitian diperoleh dari Komite Etik Penelitian FKUI dengan no 672/UN2.F1/ETIK/VII/2015.



Gambar 1

Ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*) yang telah mengalami autotomi pada pangkal ekor di area autotomi

## Histologi dengan pulasan *Hematoxylin Eosin* (HE)

Sediaan histologi diwarnai dengan pulasan *Hematoxylin Eosin* (HE) dan histokimia: formalin 10%; alkohol 70%; alkohol 80%; alkohol 95%; dan alkohol 100%; xylol; blok parafin; *hematoxylin-eosin*; akuades; pulasan *Van Gieson*.

## Imunohistokimia

Analisis imunohistokimia: antibodi primer antiCygb (*Rabbit polyclonal anti Cygb, LifeSpan BioScience LS-C312809*). antibodi sekunder (*Trekkie Universal Link dalam Starr Trek Universal HR Detection System*) (*BioCare Medical – STUHRP700 H*).

Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi, Puslitbang Biologi LIPI Cibinong; Departemen Histologi FKUI; Departemen Biokimia & Biologi Molekuler FKUI; Departemen Patofisiologi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor, sejak bulan Januari 2015 sampai dengan Februari 2018.

## Analisis semi kuantitatif sediaan histologi dan imunohistokimia

Penilaian semi kuantitatif proporsi warna hasil IHK dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Immunoratio* version 1.0c; 14.2.2011. Perangkat lunak *Immunoratio* dapat diakses secara gratis baik secara *online* atau *offline* yang dapat diunduh dari alamat website <http://software/immunoratio/index.html>. Pada awalnya perangkat lunak ini dirancang untuk analisis antibodi protein penanda kanker payudara, namun kini telah digunakan juga untuk analisis protein HIF-2 $\alpha$ . Pengamatan dilakukan dalam 5 bidang pandang untuk setiap sediaan yang berpindah sesuai arah jarum jam pada perbesaran 40 x 10.

Gambar hasil pengamatan mikroskop dibidik dengan kamera dan gambar disimpan dalam bentuk file jpg.

Penghitungan semi kuantitatif dilakukan dengan pengambilan gambar dari dokumen yang telah tersimpan dalam perangkat keras. Gambar selanjutnya di-scanning oleh program *Immunoratio*. Titik atau area pewarnaan coklat yang menandakan adanya ikatan antigen dan antibodi akan ditandai oleh perangkat lunak *Immunoratio* menjadi tampak berwarna oranye, sedangkan area yang tidak ada ikatan antigen dan antibodi akan berwarna abu-abu. Area berwarna oranye akan dinilai dengan persentase dibandingkan keseluruhan area bidang pandang (Gambar 2). Perangkat lunak *Image J* yang digunakan dengan sistem online pada komputer dengan sistem operasi *Microsoft Windows XP SP 2* 32-bit. *Processor* yang digunakan adalah *AMD Athlon(tm) 64 X2 Dual Core 5000+*, *Random Access Memory (RAM)* yang digunakan sebesar 1,87 GB.



Gambar 2

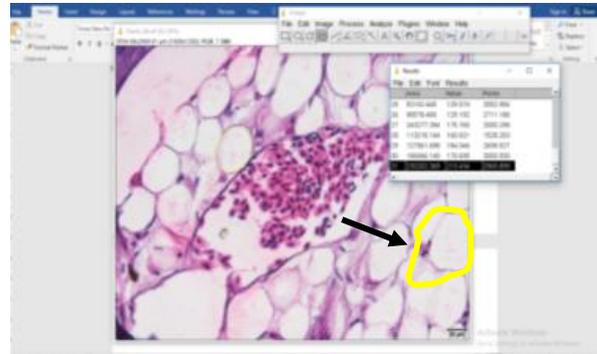
Proses *scanning* dengan perangkat lunak *Immunoratio* secara online

### Penghitungan semi kuantitatif sediaan HE dengan program *ImageJ* I-46

Perangkat lunak *ImageJ* I-46 merupakan perangkat lunak yang memiliki berbagai fitur yang dapat digunakan dalam analisis semi kuantitatif sediaan histologi dengan pewarnaan HE. Pada perangkat lunak *Image J* ini dapat dilakukan penghitungan jumlah sel serta pengukuran panjang atau luas sel serta jaringan. Perangkat lunak *Image J* dapat diunduh secara gratis dan digunakan secara *offline* (Tahrin, 2012).

Penghitungan panjang atau luas sel serta jaringan, dilakukan dengan membuka file gambar

histologi terlebih dahulu, dan dilakukan pengaturan skala gambar dengan menggunakan fitur *set scale*. Untuk penghitungan panjang digunakan fitur gambar garis sedangkan untuk luas digunakan fitur kurva. Hasil penghitungan didapat secara otomatis dengan menggunakan fitur *measure* (Gambar 3) (Ramadhani, 2012).



Gambar 3

Penghitungan luas sel dengan menggunakan perangkat lunak *Image J*. Tanda panah menunjukkan adanya garis kuning yang melingkari area sel yang akan diukur.

### Analisis Statistik

Analisis statistik dengan uji Kolmogorov smirnov dilakukan uji normalitas data. Jika tidak memenuhi standar tersebut dilakukan transformasi data dan dilakukan kembali uji normalitas. Jika data yang diperoleh ternyata homogen dan normal maka dilakukan uji parametrik. Sebaliknya jika data yang telah ditransformasi masih berdistribusi tidak normal maka digunakan uji non parametrik. Uji korelasi digunakan uji korelasi Pearson untuk data parametrik atau uji Spearman untuk data non parametrik.

### Hasil Penelitian

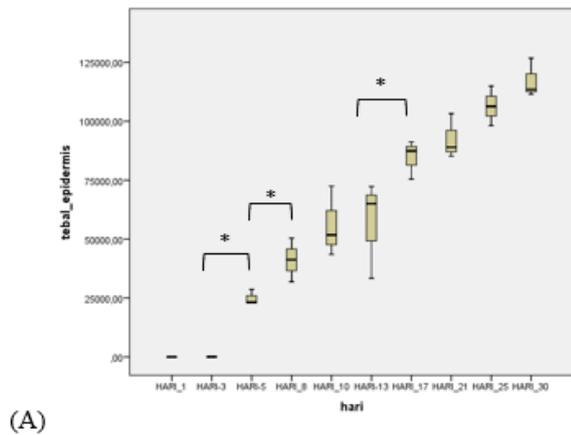
#### Data kuantitatif sediaan histologi

Data kuantitatif sediaan histologi dengan pewarnaan HE yaitu tebal jaringan epidermis dan dermis hasil regenerasi jaringan ekor cecak menggunakan perangkat lunak *ImageJ*. Tebal jaringan dan luas jaringan dinyatakan dengan skala mm. Pengambilan data dilakukan pada 5 lapang pandang pada satu preparat dengan perbesaran 40 x 10.

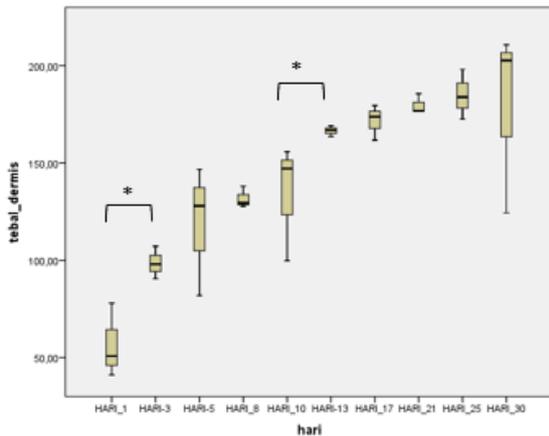
Rata-rata ketebalan jaringan epidermis dan dermis diukur pada sediaan histologi hasil regenerasi jaringan dari hari ke 1; 3; 5; 8; 10. Pengukuran dilakukan pada skala mm, pada 5 bidang pandang dengan tiga pengulangan pada setiap hari pengamatan. Hasil pengamatan disajikan dalam bentuk diagram batang (gambar 4).

Perbandingan rata-rata tebal epidermis (mm) pada gambar diagram batang, dengan uji Kruskal Wallis tampak adanya perbedaan secara signifikan antara rata-rata tebal epidermis hari ke 3 dan ke 5 (Gambar 4 (A)).

Gambar 4(B) menunjukkan adanya perbedaan rata-rata tebal dermis pada setiap hari pengamatan. Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara tebal dermis pada hari ke 1 dengan hari ke 3 ( $p < 0,05$ ).



(A)



(B)

Gambar 4

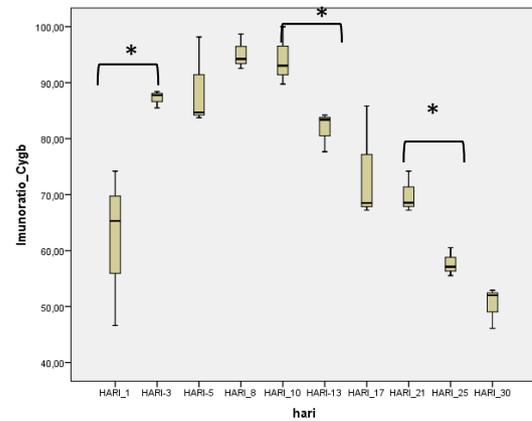
Rata-rata tebal epidermis dan dermis (mm) pada regenerasi jaringan ekor cecak dari hari ke 1 sampai hari ke 10 ( $n = 15$ ). (A) Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata (\*) tebal epidermis pada kelompok perlakuan hari ke 3 dengan hari ke 5, antara hari ke 5 dengan hari ke 8, serta antara hari ke 13 dengan hari ke 17; ( $p < 0,05$ )

(B) Uji Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata (\*) tebal epidermis pada kelompok perlakuan hari ke 1 dengan hari ke 3, serta hari ke 10 dan 13 ( $p < 0,05$ ).

### Data Immunohistomikia

Hasil pewarnaan imunohistokimia menunjukkan adanya sebaran protein Cygb pada

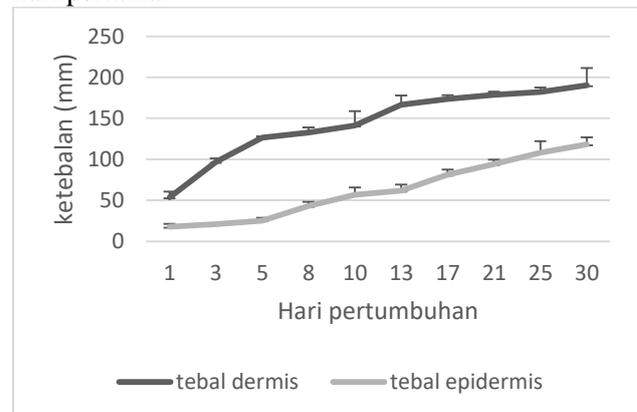
jaringan ekor cecak dari hari 1 sampai hari ke 30. Skor rata-rata presentase protein Cygb hasil pewarnaan imunohistokimia dianalisis secara kuantitatif dengan perangkat lunak *immunoratio* menunjukkan adanya keberadaan protein yang cukup tinggi pada setiap hari pengamatan dari hari ke 1 sampai hari ke 10, dan mencapai puncaknya pada hari ke 8 dan ke 10. Tampak adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3 (Gambar 5).



Gambar 5

Nilai semi kuantitatif rata-rata presentase *immunoratio* protein Cygb pada sediaan imunohistokimia.  $n = 30$ , Hasil uji non parametrik Kruskal Wallis menunjukkan adanya perbedaan nyata antara hari ke 1 dengan hari ke 3, antara hari ke 10 dan 13, serta hari ke 21 dan 25 (\*); ( $p < 0,05$ )

Pola kurva ketebalan epidermis dan dermis tampak menunjukkan kemiripan pada kedua pola kurva (Gambar 6). Pada hari ke 8 sampai 13, ke 4 kurva mengalami kenaikan yang berbeda nyata, kecuali ketebalan dermis yang telah meningkat sejak hari pertama.

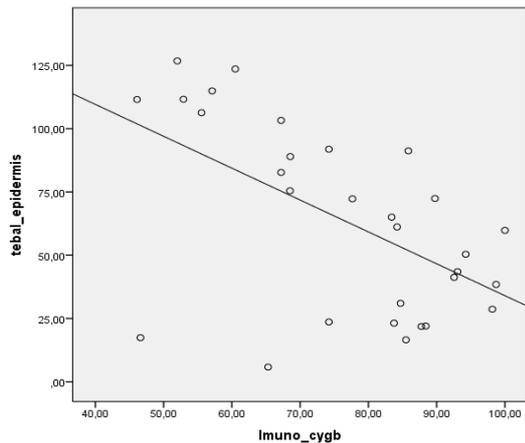


Gambar 6

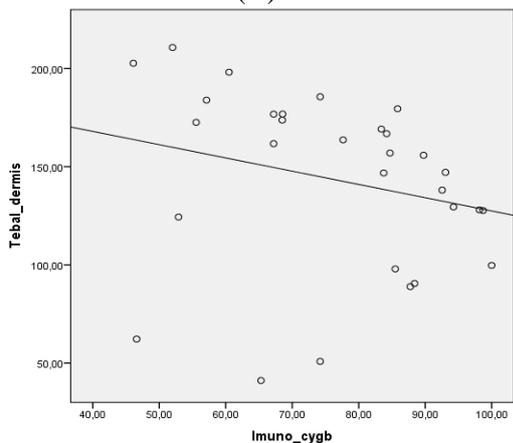
Grafik pertumbuhan ketebalan dermis dan epidermis (mm) dari hari ke 1 sampai hari ke 30 pada jaringan ekor cecak.

### Korelasi antara nilai semi kuantitatif presentase immunoratio protein Cygb dengan kuantitatif histologi jaringan ekor cecak

Korelasi antara presentase protein hasil *scanning Immunoratio* Cygb, berbeda nyata dan memiliki nilai korelasi negatif negatif kuat dan sedang secara bermakna ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,05$ ). Korelasi kuat terjadi antara protein Cygb dengan variabel ketebalan epidermis, sedangkan korelasi sedang ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,05$ ) terjadi antara protein Cygb dengan ketebalan dermis (gambar 7). Korelasi negatif menunjukkan bahwa tingginya protein Cygb akan menstimulasi peningkatan kuantitatif histologi jaringan ekor cecak sehingga terjadi peningkatan nilai kuantitatif histologi.



(A)



(B)

Gambar 7

(A) Korelasi negative kuat ( $r = 0,67$ ;  $p < 0,05$ ) antara data kuantitatif ekspresi protein Cygb dari uji Imunoratio dari hari ke 1 sampai hari ke 30 dengan pertumbuhan ketebalan epidermis (B) Korelasi negative sedang ( $r = 0,406$ ;  $p < 0,05$ ) antara data kuantitatif ekspresi protein Cygb dari uji Imunoratio dari hari ke 1 sampai hari ke 30 dengan pertumbuhan ketebalan dermis

### Hasil dan Pembahasan

Cecak rumah (*Hemidactylus platyrus*) dipilih menjadi hewan coba dalam penelitian kami karena mudah diperoleh di lingkungan sekitar dan merupakan hewan vertebrata terdekat klasifikasinya dengan mamalia yang memiliki daya regenerasi tinggi (Hutchin et al, 2014; Fusher et al, 2012). Menurut Alibardi (2010), cecak adalah kelompok hewan reptil dari Famili *Geckonidae* yang memiliki kemampuan autotomy dan memiliki daya regenerasi tinggi pada ekornya. Demikian pula menurut Osuma (2018), bahwa kelompok genus *Hemidactylus* memiliki kemampuan regenerasi ekor yang sangat tinggi. Proses regenerasi jaringan pada cecak berlangsung relatif cepat dan pada hari ke 30 telah terbentuk jaringan lengkap. Organ ekor cecak memiliki mobilitas tinggi dan terletak di luar rongga tubuh, dengan susunan jaringan lengkap meliputi kulit, otot, tulang, saraf, jaringan ikat, darah dan lemak, sama halnya seperti jaringan pada organ gerak mamalia (Ifeanyichukwu, 2006). Oleh karena itu ekor cecak rumah sangat tepat dijadikan model sederhana dalam mempelajari proses regenerasi jaringan sebagai satu organ utuh pada penelitian kami.

Ekspresi Cygb yang tinggi dari hari pertama pengamatan menunjukkan adanya upaya jaringan untuk memenuhi kebutuhan akan oksigen (Sha, 2011; Jusman et al, 2014). Meskipun ekspresi kenaikannya lambat untuk mencapai puncaknya pada hari ke 8, namun pada hari yang sama terjadi diferensiasi berbagai sel yang diperlukan untuk proses regenerasi ekor cecak. Kami menduga, peningkatan ekspresi Cygb dalam jaringan mulai hari ke 5, menunjukkan peranannya dalam menyuplai oksigen ke dalam rantai respirasi di dalam mitokondria. Cygb diduga berperan mendifusikan oksigen ke dalam mitokondria, karena pada hari-hari pertama pertumbuhan jaringan ekor cecak pembuluh darah di area luka belum terbentuk, sehingga tidak ada distribusi oksigen dari hemoglobin. Ekspresi Cygb dipertahankan lebih tinggi relative terhadap kontrol sampai hari ke 30 pengamatan, hal ini diduga untuk mempertahankan difusi oksigen selama proses regenerasi jaringan berlangsung. Pada penelitian yang dilakukan Avivi (2010) dengan menggunakan tikus Sparlax pada organ otak, menunjukkan adanya keberadaan mRNA dan protein Cygb dalam keadaan normoksia, dan meningkat saat kondisi hipoksia. Menurut Schmidt et al (2004) diperlukan keberadaan suatu protein dalam keadaan hipoksia yang mampu mengikat oksigen dari sel darah merah dan membawanya ke dalam mitokondria, yaitu protein Cygb. Tingginya daya afinitas Cygb terhadap oksigen membuktikan

bahwa Cygb berperan sebagai pembawa oksigen intraseluler. Cygb akan membawa oksigen ke dalam mitokondria untuk reaksi fosforilasi oksidasi, seperti halnya fungsi Mb dalam sel otot (Lechauve, 2010). Sehingga pada regenerasi jaringan ekor cecak ini, proses metabolisme dan keberlangsungan aktivitas sel dapat tetap terjadi.

Pembentukan sel epitel pada hari pertama pengamatan yang berperan menutup luka, menunjukkan adanya aktivitas proliferasi sel dan migrasi sel basal lamina dari basal jaringan epitel menuju lapisan epitel paling luar, berdiferensiasi dari bentuk sel bulat menjadi lebih pipih. Hal serupa ditemukan pada regenerasi jari tikus, terjadi migrasi dan proliferasi sel epidermis, membentuk lapisan epidermis baru dan berlangsung relatif cepat (Pirkmajer, 2010). Hal ini juga ditemukan pada regenerasi jari salamander, proses pembentukan epitel yang baru juga terjadi relatif cepat untuk menutupi area luka agar proses penyembuhan luka dan regenerasi jaringan dapat berlangsung (Corpechot, 2002).

Pada pada hari ke 5 setelah autotomi, jaringan ekor cecak mengalami penambahan ketebalan jaringan epidermis dan dermis. Agregat sel tunas pada jaringan ekor cecak tampak menyebar pada lapisan dermis pada fase ini sebagai bakal pembentuk jaringan otot dan jaringan ikat. Pada uji korelasi terdapat korelasi kuat antara peningkatan ketebalan epidermis dan dermis dengan ekspresi Cygb.

Hasil uji semi kuantitatif histologi menunjukkan lapisan dermis yang makin menebal secara signifikan pada 13 hari pertama. Pada pertumbuhan lapisan epitel tampak adanya penebalan yang signifikan pada pertumbuhan jaringan ekor cecak, hal ini menunjukkan bahwa sel basal lamina aktif berproliferasi secara signifikan pada setiap fase pertumbuhan ekor cecak.

Tingginya aktivitas sel pada periode ini menunjukkan bahwa sel memerlukan oksigen dan energi yang cukup tinggi. Pada regenerasi planaria, regenerasi jaringan memerlukan proliferasi dan diferensiasi sel yang berkaitan erat dengan peningkatan kebutuhan akan energi yang tinggi (Scheerer, 2013). Demikian pula halnya pada ekor cecak, diduga terjadi peningkatan keperluan energi yang tinggi menyebabkan kebutuhan akan oksigen meningkat untuk proses metabolisme pada regenerasi ekor cecak. Tingginya kebutuhan akan oksigen namun oksigen dari lingkungan tidak bertambah, menyebabkan jaringan berada dalam keadaan hipoksia relatif. Menurut Gauron, ketidakseimbangan kebutuhan oksigen dengan suplai oksigen menyebabkan jaringan mengalami

keadaan hipoksia (Guedelhoefer, 2014; Liu et al, 2013).

Hasil uji korelasi menghasilkan nilai korelasi negatif sedang antara Cygb dengan variabel pertumbuhan ketebalan dermis, epidermis, Korelasi negative menunjukkan bahwa pada saat suplai oksigen atau fluks oksigen telah mencukupi, maka ekspresi Cygb dibatasi sampai batas minimum, sedangkan sel dan jaringan terus melakukan pertumbuhan sampai batas tertentu. Korelasi kuat antara Ekspresi protein Cygb dengan pertumbuhan ketebalan epidermis dan korelasi sedang dengan pertumbuhan ketebalan dermis menunjukkan adanya peranan Cygb terhadap pertumbuhan Epidermis dan dermis. Cygb memiliki peran dalam difusi oksigen ke dalam mitokondria sehingga proses metabolisme sel epidermis dan dermis dapat berlangsung dan memicu terjadinya pertumbuhan ketebalan epidermis dan dermis.

### Kesimpulan

Terjadinya korelasi antara ekspresi Cygb yang berperan pada difusi oksigen ke dalam mitokondria, dengan peningkatan ketebalan epidermis dan dermis menunjukkan adanya peranan protein Cygb selama proses regenerasi jaringan ekor cecak (*Hemidactylus platyurus*).

### Daftar Pustaka

- Alibardi L. *Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb Regeneration in Lizards*. New York: Springer; 2010.
- Avivi A, Gerlach F, Joel A, Reuss S, Burmester T, Nevo E. Neuroglobin, cytoglobin, and myoglobin contribute to hypoxia adaptation of the subterranean mole rat *Spalax*. *PNAS*. 2010; 107 (50): 21570—5
- Corpechot C, Barbu V, Wendum D, et al. Hypoxia-induced VEGF and collagen I expressions are associated with angiogenesis and fibrogenesis in experimental cirrhosis. *Hepatology*. 2002;35(5):1010-1021.
- Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology*. 2006;43(2 SUPPL. 1):45-53. doi:10.1053/jhep.2002.32524
- Fisher RE, Geiger LA, Stroik LK, et al. A Histological Comparison of the Original and Regenerated Tail in the Green Anole, *Anolis carolinensis*. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol*. 2012;295(10):1609-1619. doi:10.1002/ar.22537.

- Guedelhofer OC, Alvarado AS. Amputation induces stem cell mobilization to sites of injury during planarian regeneration. *Development*. 2012;139(19):3510-3520. doi:10.1242/dev.082099.
- Hutchins ED, Markov GJ, Eckalbar WL, et al. Transcriptomic analysis of tail regeneration in the lizard *Anolis carolinensis* reveals activation of conserved vertebrate developmental and repair mechanisms. *PLoS One*. 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0105004
- Ifeanyichukwu P. Neural Tissue And Complete Regeneration Of The Tail Of The Gekkonid Lizard, *Hemidactylus flaviviridis*. *Anim Res Int*. 2006;3:415-418.
- Krafts KP. The hidden drama Tissue repair. *Organogenesis*. 2010;6(4):225-33.
- Lechavue C, Chauvierre C, Dewilde S, Moens L, Green BN, Marden MC, et al. Cytoglobin conformations and disulfide bond formation. *FEBS J*. 2010;277(12):2696-704
- Liu X, Tong J, Zweier JR, et al. Differences in oxygen-dependent nitric oxide metabolism by cytoglobin and myoglobin account for their differing functional roles. *FEBS J*. 2013;280(15):3621-3631. doi:10.1111/febs.12352.
- Lozito TP, Tuan RS. Lizard tail regeneration: Regulation of two distinct cartilage regions by Indian hedgehog. *Dev Biol*. 2015;399(2):249-262. doi:10.1016/j.ydbio.2014.12.036
- Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med*. 2008;3(1):1-5.
- Mescher AL. *Histologi Dasar queiraJun*. 12th ed. (Hartanto H, ed.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran; 2011.
- Mescher AL. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. 2017;(March):39-53.
- Nakatani Y, Kawakami A, Kudo A. Cellular and mollecular processes of regeneration with special emphasis on fish fins. *Dev growth Differ*. 2007; 49: 145-54.
- Oleksiewicz U, Liloglou T, Tasopoulou KM, et al. Cytoglobin has bimodal: Tumour suppressor and oncogene functions in lung cancer cell lines. *Hum Mol Genet*. 2013;22(16):3207-3217
- Osuma EA, Riggs DW, Gibb AA, Hill BG. High throughput measurement of metabolisme in planarians reveals activation of glycolysis during regeneration. *Regeneration*. 2018;(August):1-9.
- Pirkmajer S, Filipovic D, Mars T, Mis K, Grubic Z. HIF-1alpha response to hypoxia is functionally separated from the glucocorticoid stress response in the in vitro regenerating human skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(42):R1693-R1700. doi:10.1152/ajpregu.00133.2010.
- Ramadhani D, Kurnia I, Soetopo S, Tetriana D, Ramli I, Budiningsih, Andrijono, Kurjana T, Tobing MDL. Analisis Serta Stitching Citra Imunohistokimia Mib-1 Dengan Immunoratio dan perangkat lunak Nish Element. *Lokakrya komputansi dala sains dan Teknologi Nuklir*. 2012;(October): 187-97.
- Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012;49(1):35-43.
- Sha S. Functional Characterization of cytoglobin. Thesis, University of Hongkong 2011.
- Scheerer N, Dehne N, Stockmann C, et al. Myeloid Hypoxia-Inducible Factor-1 Is Essential for Skeletal Muscle Regeneration in Mice. *J Immunol*. 2013;191(1):407-414. doi:10.4049/jimmunol.1103779.
- Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, et al. Cytoglobin Is a Respiratory Protein in Connective Tissue and Neurons, Which Is Up-regulated by Hypoxia. *J Biol Chem*. 2004;279(9):8063-8069. doi:10.1074/jbc.M310540200.
- Tahrin Mahmood P-CY. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *NAm J Med Sci*. 2012;4(9):429-34.
- Theise ND, Bushell W. *From the Global to The Local: Pathways For The Transduction of Indo-Sino-Tibetan Cognitive-Behavioral Practices into Site Specific Tissue Regenerative Effects*. New York; 2007.