

Analisis Efek Paparan Kadmium Konsentrasi Rendah pada Morfologi dan Viabilitas Sel HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Analysis of Low-level Cadmium Exposure Effects on HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) Cell Viability and Morphology

Kristianningrum Dian Sofiana¹, Provisia Marthalita Y.W², Khotimah Husnul³, M Aris Widodo³

¹Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jalan Kalimantan No.37, Jember, Indonesia, 68121

²Magister Biomedis, Universitas Brawijaya

³Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
Jalan Veteran, Malang, Indonesia, 65145

e-mail korespondensi: kds sofiana.fk@unej.ac.id

Abstrak

Kadmium merupakan logam berat yang mudah ditemukan dalam kehidupan sehari-hari. Logam ini bersifat toksik dan mencemari lingkungan serta berpengaruh pada kesehatan. Tujuan utama dari penelitian ini untuk mengetahui efek paparan kadmium konsentrasi rendah dalam waktu akut terhadap morfologi dan viabilitas sel HUVECs. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan model *in vitro* menggunakan sel HUVECs. Sel HUVECs dibagi menjadi 4 kelompok dengan 1 kelompok kontrol (tanpa induksi CdCl₂) dan 3 kelompok perlakuan dengan pemberian induksi CdCl₂ dengan konsentrasi 0,153 µg/L, 1,53 µg/L dan 15,3 µg/L. Dan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali pada masing-masing kelompok. Morfologi sel diperiksa menggunakan mikroskop inverted. Viabilitas sel diperiksa menggunakan MTT assay. Data dianalisa menggunakan uji statistik Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan *man Whitney*. Untuk uji korelasi menggunakan uji korelasi Spearman. Morfologi kelompok sel HUVECs yang diinduksi CdCl₂ konsentrasi 15,3 µg/L morfologinya terlihat berbeda signifikan dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0.05$). Viabilitas sel kelompok HUVECs yang diinduksi CdCl₂ 15,3 µg/L berbeda signifikan dengan kelompok kontrol. Uji korelasi didapatkan $R = -0,665$ dengan probabilitas 0,001 yang bermakna semakin tinggi konsentrasi CdCl₂ semakin rendah viabilitas sel. Kadmium dalam konsentrasi rendah menyebabkan perubahan morfologi sel dan menurunkan viabilitas sel.

Kata kunci: HUVEC, kadmium, morfologi sel, viabilitas sel

Abstract

*Cadmium is a heavy metal that could be found in daily life. This metal has a toxicity, could contaminate the environment, and affect human health. The main aim of this research was to find the effect of low concentration Cadmium exposure in acute time toward HUVECs cell morphology and viability. This was a true experimental research with in vitro model using HUVECs cell, where HUVECs cell was divided into four groups. One control group (without CdCl₂ induction) and three treatment groups with CdCl₂ induction with various concentrations, 0,153 µg/L, 1,53 µg/L and 15,3 µg/L. The trial was repeated five times for each group. Cell morphology was observed with an inverted microscope. Cell viability was examined by MTT assay. Data were analyzed using Kruskal Wallis statistical test and continue with the *Man Whitney* test. Correlation test was using Spearman. Morphology of treatment group HUVECs cell induced by CdCl₂ concentration 15,3 µg/L looked significantly different compared with control group ($p < 0.05$). Cell viability on group HUVECs induced by CdCl₂ 15,3 µg/L significantly different compared with the control group. The correlation test resulted $R = -0,665$ with probability 0.001 which means the higher concentration of CdCl₂ the lower the viability of cells. Cadmium in low concentration induces cell morphology change and reduce cell viability.*

Keywords: HUVEC, cadmium, cell morphology, cell viability

Pendahuluan

Kadmium merupakan salah satu logam berat yang berada dalam sistem tabel periodik kimia dengan nomor atom 48 dan masa atom 112,41. Berbentuk logam putih perak dan biasanya di alam berikatan dengan ion lain (UNEP, 2010). Logam ini dikenal bersifat toksik pada lingkungan maupun kesehatan (Jarup dan Akseon, 2009).

Kadmium ini mengkontaminasi lingkungan, air, dan makanan. Studi yang dilaporkan oleh Sutrisno dan Kuntyastuti menemukan bahwa lahan pertanian di Indonesia mengalami pencemaran logam berat ini. Air sumur di Driyo Gresik mengalami pencemaran kadmium dan berefek terhadap peningkatan kadar kadmium dalam darah penduduknya (Sutrisno dan Budiyono, 2004). Penelitian terhadap beras di Iran ditemukan bahwa beras Iran memiliki kadar kadmium lebih dari 0,2 mg/kg yang merupakan ambang batas keamanan kadmium yang ditetapkan oleh WHO (Mehrnia, 2013)

Sumber kontaminasi paparan kadmium antara lain bahan bakar minyak, produksi besi dan baja, inerserasi, rokok, dan pupuk (Sharma *et al.*, 2015). Paparan logam ini bisa memasuki tubuh dengan cara inhalasi, peroral, maupun kontak dengan kulit namun kasus ini jarang (Faroon *et al.*, 2012). Dan ini berdampak pada kesehatan.

Beberapa penelitian epidemiologi menemukan ada kaitan antara kadmium di dalam darah maupun di dalam urin yang berkaitan dengan penyakit. Konsentrasi kadmium 2,28 µg/L memiliki faktor resiko terjadinya kanker payudara pada wanita (Peng *et al.*, 2015). Survey yang dilakukan National Health and Nutrition Examination Survey (1999–2006) ditemukan kadar kadmium 0,41 µg/L memiliki faktor resiko gagal ginjal kronis (a Navas-Acien *et al.*, 2009). Penelitian di Korea oleh Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) menemukan bahwa dengan kadar konsentrasi kadmium di dalam darah sebesar 1,53 µg/L memiliki faktor resiko terjadinya IHD (Infark Heart Disease) (Lee *et al.*, 2011). Kadmium memperburuk pasien dengan peritoneal dialisis (Lee *et al.*, 2016). Logam ini juga menurunkan kepadatan tulang (Schutee *et al.*, 2008). Bahkan tingginya logam ini dalam darah berasosiasi dengan penurunan fungsi paru pada survei di Korea (Oh *et al.*, 2014).

Menurut studi yang dilakukan Bernof kadmium merusak histologi saraf pusat dengan mereduksi

asetilkolinesterase, menurunkan glutathion, SOD, katalase dengan meningkatkan stres oksidatif sehingga menyebabkan terjadinya apoptosis. Ros dari stress oksidatif akibat efek kadmium ini juga meningkat akibat pembebasan logam aktif redoks sehingga terjadi peningkatan ion besi yang bebas melalui reaksi fenton (Casalino *et al.*, 1997; Weisberg *et al.*, 2003). Selain itu logam ini juga melakukan penghambatan aktivitas kompleks II dan III mitokondria dengan berikatan dengan semi ubiquinon dan sitokrom b yang berakibat gangguan pada transfer elektron sehingga terjadi kebocoran elektron superoksida (Wang *et al.*, 2004).

Berdasarkan fakta yang telah diuraikan di atas, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis pengaruh kadmium konsentrasi rendah dari penelitian epidemiologi Yang *et al.* (2012) terhadap viabilitas HUVECs.

Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni (True Experimental Laboratorik) dengan model in vitro. Post test only dengan 4 kelompok perlakuan. Pertama HUVECs tanpa CdCl₂, HUVECs dengan CdCl₂ konsentrasi 0,153, 1,53, 15,3 µg/L. Perlakuan diberikan selama 48 jam. Dan diakhir dilakukan pemeriksaan morfologi HUVECs dan Viabilitas sel. Sampel diambil dari kultur sel HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*). Penelitian ini memiliki 5 replikasi pada semua kelompok. Penelitian disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya No.133A/EC/KEPK-S2/04/2017.

Isolasi dan Kultur Human Umbilical Vein Endhotel Cells (HUVECs)

Tali pusat sepanjang 15-20 cm diambil dari Ibu dan Bayi yang sehat lewat persalinan secara Sectio caesaria (SC). Sel endotel diisolasi dan diinkubasi menggunakan kolagenase tipe 2 (sigma) selanjutnya diletakan dalam medium kultur M199 yang berisi 100 iu/mL penisilin, 100 µg/ml streptomisin dan 10 % PBS. Sel ditanam di plate 96 yang berisi gelatin 0,2% kemudian diinkubasi (CO₂, 5% 37^o C). Medium kultur diganti setiap 2 hari. Sel menjadi monolayer dalam waktu 3-hari. Setelah itu diberikan perlakuan.

Perlakuan

Pada hari 3 saat sel menjadi konfluen 70% media kultur diganti dengan media yang berisi 0,153, 1,53, 15,3 µg/L CdCl₂ (Sigma) untuk perlakuan. Untuk kontrol negatif hanya penggantian

medium tanpa tambahan CdCl₂. Inkubasi perlakuan dilakukan selama 48 jam.

Pengukuran Parameter

MTT assay

Viabilitas sel diukur dengan metode kalorimetri menggunakan reagen MTT dari CellQuanti-MTT Cell Viability Assay Kit (CQMT-500) (Bioassay System) dengan metode tereduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase sehingga terbentuk kristal ungu yang tidak larut air. Sel HUVECs yang sudah diberi perlakuan yang berada di well plate 96 diberikan 15 µl reagen MTT selanjutnya diinkubasi selama 4 jam dalam suhu ruangan hingga terbentuk kristal ungu. Selanjutnya diberikan 100 µl reagen pelarut pada masing masing well yang membuat kristal ungu menjadi larut. Selanjutnya diletakan pada shaker agar reagen pelarut tadi tercampur. selanjutnya absorbansinya dibaca menggunakan elisa reader dengan panjang gelombang 570 nm (Bio-Rad Laboratories, USA) di Biomedis Sentral Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Indonesia.

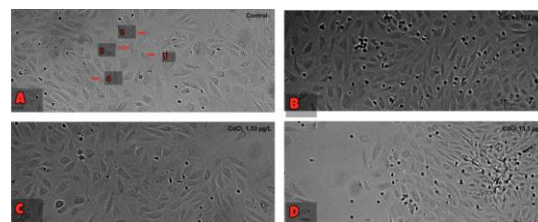
Analisis Data

Normalitas data diuji menggunakan saphiro wilk, untuk homogenitas menggunakan levine tes. Untuk data tidak homogen dan abnormal sehingga menggunakan non parametrik kruskal wallis dan dilanjutkan dengan man whitney signifikansi $p < 0,05$. untuk uji korelasi menggunakan uji korelasi non parametrik spearman. Dengan signifikasi $p < 0,05$ Software statistik menggunakan IBM SPSS 23.

Hasil Penelitian

Setelah peparan CdCl₂ berbagai dosis dalam 48 jam didapatkan hasil morfologi mikroskopik sebagai berikut. Pada gambar 1 didapatkan HUVEC tanpa paparan cadmium terdiri dari inti sel, sitoplasma, membran plasma dan matriks ekstraseluler, memiliki bentuk cobble stone dan juga memiliki batas yang jelas antar sel, Pada Huvec yang mendapat paparan CdCl₂ konsentrasi 0,153 µg/L dan 1,53 µg/L memiliki bentuk morfologi yang tak jauh berbeda dengan control. Sedangkan pada HUVEC dengan paparan CdCl₂ 15,3 µg/L memiliki bentuk yang berbeda dibanding kelompok sebelumnya. Pada kelompok ini terlihat batas sel yang mulai tidak jelas.

HUVECs tanpa induksi CdCl₂ (Kontrol) setelah 48 jam terlihat bentuk sel coble stone, pipih, dan jarak antar sel teratur. HUVECs yang diinduksi CdCl₂ 0,153 dan 1,53 µg/L setelah diinkubasi 48 jam secara morfologi tidak jauh berbeda dengan HUVECs normal (kontrol). HUVECs dengan induksi CdCl₂ 15,3 µg/L dengan inkubasi 48 jam mengalami perbedaan morfologi dibanding kelompok sebelumnya. Jarak antar sel mulai tidak teratur, kerapatan antar sel menurun dan terlihat bentuk ireguler meskipun tidak signifikan.



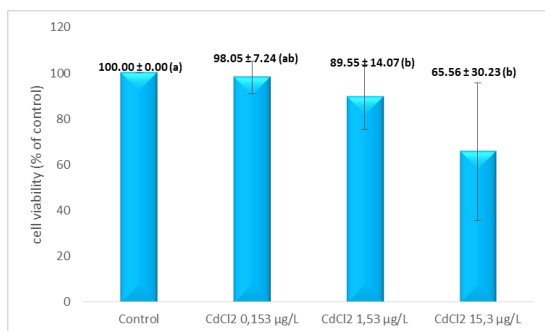
Gambar 1. Pengamatan Kultur Sel Endotel Yang Dipapar CdCl₂: (a) Kontrol A.Nucleus B.Cytoplsm C. plasma membrane D.Extracellular matrix (b) Konsentrasi CdCl₂ 0,153 µg/L, (c) Konsentrasi CdCl₂ 1,53 µg/L, (d) Konsentrasi CdCl₂ 15,3 µg/L. Pengamatan menggunakan *inverted microscope* (100x), tanpa pewarnaan

Pembahasan

HUVECs adalah sel yang dikultur dari vena tali pusat bayi yang digunakan secara luas dalam penelitian di bidang vaskuler, baik fisiologi maupun patofisiologi. HUVECs yang normal memiliki ciri morfologi sel endotel berbentuk coblestone dengan ciri spesifik sel yang berbentuk pipih dengan jarak yang teratur serta bagian tengah bulat terang dan monolayer. Terdiri dari inti sel, sitoplasma, membran sel dan matriks ekstraseluler (Arjita, *et al.*, 2002; Sarbini, *et al.*, 2011), kontak antar sel terlihat jelas (Baktiyani, *et al.*, 2007). Sedangkan HUVECs yang abnormal memiliki ciri sel yang shrinkage dan tampak adanya vakuola (Baktiyani, *et al.*, 2007), mengalami penurunan kerapatan dan bentuknya ireguler (Duan, 2013).

Pada penelitian kami morfologi sel HUVECs normal tanpa paparan sesuai dengan penelitian sarbini et al pada tahun 2011. Namun HUVECs yang mendapat paparan CdCl₂ pada konsentrasi 0,153 µg/L dan 1,53 µg/L hampir sama penampakan morfologinya dengan HUVECs

normal. Paparan CdCl₂ 15,3 µg/L mulai nampak menurunnya kerapatan dari sel endotel dan mengalami bentuk yang mulai ireguler. Semakin tinggi konsentrasi CdCl₂ semakin tidak terlihat jelas bentuk pipih dan coblestone. Menurut Nagarajan *et al.* (2013) induksi Cd pada konsentrasi rendah mengubah bentuk morfologi sel dengan mengubahnya menjadi bentuk rounded diduga karena ada depolymerization protein hanya sedikit saja yang selnya mengalami kematian.



Gambar 2. Pengukuran viability cell . Pengaruh CdCl₂ pada HUVECs: Kontrol Negatif (Tanpa CdCl₂), CdCl₂ 0,153µg/L, 1,53 µg/L dan 15,3 µg/L. Data disajikan sebagai rata-rata ± SD. CdCl₂ menurunkan viabilitas sel

HUVEC yang diinduksi dengan CdCl₂ berbagai konsentrasi selama 48 jam dan diperiksa menggunakan MTT assay (Gambar 2) didapatkan hasil viabilitas sel mengalami penurunan yang signifikan. Pada pemberian induksi CdCl₂ 15,3 µg/L (65.56± 30.23)% viabilitas sel menurun drastis dibandingkan dengan induksi CdCl₂ 0,153 µg/L (98.05±7.24)% dan 1,53 µg/L (89.55±14.07)% namun tidak berbeda signifikan . Perbedaan signifikan didapatkan antara kelompok HUVEC yang diinduksi CdCl₂ 15,3 µg/L dengan kelompok kontrol (100±0.00)%. Dan untuk melihat pengaruh konsentrasi pemberian CdCl₂ terhadap viabilitas sel dilakukan uji korelasi dan didapatkan correlation coefficient (R² = -0,665) dan probabilitas (sig.2 tailed) 0,001. Yang dapat diartikan ada hubungan yang kuat dimana semakin tinggi konsentrasi CdCl₂ yang diberikan semakin rendah viabilitas sel.

Pada studi kami didapatkan HUVECs yang mendapat induksi CdCl₂ pada waktu 48 jam mampu menurunkan viabilitas sel. Hal ini serupa dengan penelitian sel line yang diinduksi dengan CdCl₂ dengan konsentrasi 2,5-15 µg/ml

didapatkan semakin besar konsentrasi CdCl₂ semakin menurun viabilitas dari sel line (Ravindran *et al.*, 2017). Hasil kultur sel line (HepG2) dengan induksi CdCl₂ 1-5 µg/ml didapatkan penurunan viabilitas sel sejalan dengan peningkatan konsentrasi CdCl₂ (Skipper *et al.*, 2016). Hampir senada dengan penelitian messner *et al.* yang menyatakan bahwa dengan peningkatan konsentrasi kadmium meningkatkan kejadian apoptosis pada sel. Hal ini diduga karena terjadi peningkatan ROS akibat induksi Cd pada studi yang dilakukan pada sel line SH5Y5Y dan PC12 yang mendapat paparan Cd dengan konsentrasi 0-20 µM didapatkan semakin tinggi konsentrasi Cd yang dipaparkan semakin tinggi produksi ROS (Chen *et al.*, 2011).

superoxide anion (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂), hydroxy radical (*OH) dan lipid peroxides (*L) merupakan radikal bebas yang bisa timbul akibat paparan dari Cd. Cd ini memicu ROS dengan mekanisme tidak langsung disebabkan karena bukan termasuk logam aktif redoks sehingga beberapa mekanisme antara lain inflamasi, penurunan glutation, dan mempengaruhi ion besi melalui reaksi fenton (Liu *et al.*, 2009). Ros berperan penting dengan kejadian apoptosis dengan mempengaruhi pengaturan dari MAPK dan menghambat fosforilasi ERK1/2 (Hu *et al.*, 2015).

Program kematian sel dapat dipicu oleh kadmium melalui paparan dosis rendah dalam waktu yang tak lama dengan mempengaruhi aktivitas selular, merusak DNA dan menyebabkan kerusakan oksidatif (Yang *et al.*, 2012). Ada beberapa jalur yang diduga menjadi jalur terjadinya apoptosis akibat induksi kadmium ini antara lain dengan memasuki sel melalui ca channel dan meningkatkan regulasi dari IP3R1 (inositol 1,4,5 triphosphat receptor) sehingga menyebabkan ion ca²⁺ keluar dari retikulum endoplasma, dan ca²⁺ inilah yang mengaktifasi calpain, menginduksi fragmentasi DNA dan apoptosis (Li *et al.*, 2000). Induksi Cd juga dapat memicu cytochrom C mengaktifasi caspase 9 yang juga merupakan jalur apoptosis (Kondoh *et al.*, 2002).

Kesimpulan

Dari penelitian in vitro didapatkan bahwa induksi kadmium pada sel HUVECs dengan konsentrasi rendah dan waktu paparan yang akut bersifat toksik pada sel dan menyebabkan perubahan morfologi serta menurunkan viabilitas sel.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih pada Rumah Sakit Permata Bunda sebagai tempat Pengambilan sampel, Ibu Bunga Prihardina & Pak. Lady ngatiril Yudha sebagai asisten teknik laboratorium.

Daftar Pustaka

- Arjita, I.P.D., Widodo, M.A., Widjajanto, E. 2002. *Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesis Nitric Oxide dari Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEs) Culture dengan Teknik Bioassay*. Biosain;1.
- Baktiyani S.C.W. 2007. *The Influence of The Combination of Nac With Vitamin C and E to Oxidative Stress on Huvecs Exposed with Eclampsia Plasma*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 23 (3).
- Bernhoft R.A. 2013. Cadmium Toxicity and Treatment. The Scientific World Journal.
- Casalino E, Sblano C, Landriscina C. 1997. *Enzyme Activity Alteration by Cadmium Administration to Rats: The Possibility of Iron Involvement in Lipid Peroxidation*. Arch Biochem Biophys. (346):171–179.
- Chen L, Xu B, Liu L, et al. 2011. *Cadmium induction of reactive oxygen species activates mTOR pathway, leading to neuronal cell death*. Free radical biology & medicine. 50(5):624-632. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.032.
- Duan J, Yu Y, Li Y, Yu Y, Li Y, et al. 2013. *Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint*. PLoS ONE. 8(4): e62087. doi:10.1371/journal.pone.0062087
- Faroon, O., Ashizawa D.V.M.A., Wright S., Tucker P., Jenkins, K. 2012. *Toxicological Profile For Cadmium*, U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Hu K.-H. Li W.-X., Sun M.-Y. Zhang S.-B. Fan C.-X. Wu Q. Zhu W. Xu X. 2015. *Cadmium Induced Apoptosis in MG63 Cells by Increasing ROS, Activation of p38 MAPK and Inhibition of ERK 1/2 Pathways*. Cell Physiol Biochem. 36:642-654. doi: 10.1159/000430127
- IARC. 2012. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Arsenic, Metals, Fibres and Dusts. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer;. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100C.) Cadmium And Cadmium Compounds. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304372/>.
- Järup, L., Åkesson, A. 2009. *Dietary Cadmium Exposure—A Review of Recent Risk Assessments*. Epidemiology. 20(6):S61. doi:10.1097/01.ede.0000362890.34654.dd
- Kondoh, M., Ogasawara, S., Araragi, S., Higashimoto, M., Sato, M. 2001. *Cytochrome C Release from Mitochondria Induced by Cadmium*. Journal of Health Science. 47(1).
- Lee, M., Park S.K., Hub, H., Lee, S. 2011. *Cadmium exposure and cardiovascular disease in the 2005 Korea National Health and Nutrition Examination Survey*. Environ Res.; 111(1): 171–176. doi:10.1016/j.envres.2010.10.006
- Lee, C., Weng CH., Huang W.H., Yen, T.H., Lin, J.L., Lin-Tan, D.T., RN, Chen, K.H., Hsu, C.W. 2016. *Association Between Blood Cadmium Levels and Mortality in Peritoneal Dialysis, Medicine® Observational Study*. doi: 10.1097/MD.0000000000003717
- Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanabe K, Arai Y, Zhou ZC, Kasuya M. 2000. *Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways*. The Journal Of Biological Chemistry. 275(50): 39702–39709. doi: 10.1074/jbc.M007369200
- Liu J, Qu W, Kadiiska MB. 2009. *Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis*. Toxicology and applied

- pharmacology. 238(3):209-214. doi:10.1016/j.taap.2009.01.029.
- Mehrnia, M.A. 2013. *Cadmium Levels in Rice Product of South of Iran and its Daily Intake*. Intl J Agri Crop Sci. 5(20):2349-2351.
- Messner, B., Ploner, C., Laufer, G., Ringer, T., Bernhard, D. 2015. *Cadmium activates a programmed, lysosomal membrane permeabilization-dependent necrosis pathway*. Toxicology Letter. 212:268–275.
- Nagarajan S, Rajendran S, Saran U, Priya MK, Swaminathan A, Siamwala JH, Sinha S, Veeriah V, Sonar P, Jadhav V, Jaffar Ali BM, Chatterjee S. 2013. *Nitric oxide protects endothelium from cadmium mediated leakiness*. Cell Biol Int. 37(5):495-506. doi: 10.1002/cbin.10070. Epub 2013 Mar 7.
- Navas-Acien A., Tellez-Plaza, M., Guallar, E., Muntner, P., Silbergeld E., Jaar, B., Weaver, V. 2009. *Blood Cadmium and Lead and Chronic Kidney Disease in US Adults: A Joint Analysis*. American Journal of Epidemiology. 170(9) doi: 10.1093/aje/kwp248
- Oh, C-M., Oh, I-H., Lee, J-K., Park, Y. H., Choe, B-K., Yoon, T-Y., Choi, J-M. 2014. *Blood cadmium levels are associated with a decline in lung function in males*, Environmental Research. 132:119–125. doi:10.1016/j.envres.2014.04.008
- Peng, L., Huang, Y., Zhang, J., Peng, Y., Lin, X., Wu, K., Huo, X. 2015. *Cadmium exposure and the risk of breast cancer in Chaoshan population of southeast China*. Environ Sci Pollut Res Int. 22(24):19870-8. doi: 10.1007/s11356-015-5212-1.
- Ravindran, G., Chakrabarty, D., Sarkar, A. 2016. *Cell specific stress responses of cadmium-induced cytotoxicity*. Animal Cells and Systems. 21(1):23-30, doi: 10.1080/19768354.2016.1267041
- Sarbini, D., Sargowo, D., Rohman, M.S. 2011. *Hibiscus Sabdariffa Linn) terhadap NF- κ B, TNF- α dan ICAM-1 pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Cultured yang dipapar Low Density Lipoprotein (LDL) Teroksidasi*. J Exp.Life.Sci. 1(2).
- Schutte, R., Nawrot, T.S., Richart, T., Thijs, L., Vanderschueren, D., Kuznetsova, T., Hecke, E.V., Roels, H.A., Staessen, J.A. 2008. *Bone Resorption and Environmental Exposure to Cadmium in Women: A Population Study*, Environmental Health Perspectives. 116(6)
- Sharma H., Rawal N., Mathew B.B. 2015. *Cadmium: Toxicity effect and its mechanism*. Research Journal of Pharmacology and Toxicology. 01(01):1-5.
- Skipper, A., Sims, J., N., Yedjou, C.G., Tchounwou, P.B. 2016. *Cadmium Chloride Induces DNA Damage and Apoptosis of Human Liver Carcinoma Cells via Oxidative Stress*, Int. J. Environ. Res. Public Health. (13) 88; doi:10.3390/ijerph13010088
- Sutrisno, Budiyono. 2004. *Pengaruh Pencemaran Kadmium Pada Air Sumur Untuk Minum Dan Memasak Terhadap Kesehatan Wanita Di Desa Bambe Kecamatan Driyorejo, Gresik*. J. Kesehat Lingkungan Indonesia. 3(1).
- Sutrisno, Kuntastyuti H., 2015. *Pengelolaan Cemaran Kadmium Pada Lahan Pertanian Di Indonesia*. Buletin Palawija. 13(1).
- Wang Y., Satoh A., Warren G. 2004. *Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65*. JBC Papers. 280(6):4921-8.
- Weisberg M., Joseph P., Hele B., Beyerrmann D. 2003. *Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis*. Toxicology. 192(2–3): 95 – 117.
- Yang XF, Ge YM, Zhang HT, Ning HM, Jiang JQ, Qi YH, Wang ZL. 2012. *Damaging effects of water-borne cadmium chloride on DNA of lung cells of immature mice*. Genet Mol Res. (11):4323–4329. doi: 10.4238/2012.