

Efek Antiproliferatif Pentagamavunon-0 terhadap Sel Kanker Payudara T47D *)

Antiproliferative Effect of Pentagamavunon-0 on Breast Cancer Cell Line T47D

Edy Meiyanto¹, Supardjan¹, Muhammad Da'i², Dewi Agustina³

1) CCRC-¹Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

2) Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

3) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Kanker payudara merupakan penyakit yang banyak menyerang wanita dan sulit disembuhkan. Pentagamavunon-0 (2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksi)-benzilidin-siklopentanon: PGV-0), merupakan analog kurkumin (1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion) yang telah banyak diteliti aktifitas antikankernya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antiproliferatif PGV-0 terhadap sel kanker payudara T47D. Uji dilakukan dengan pengamatan efek sitotoksik dengan metoda MTT. Kemampuan penghambatan senyawa terhadap proliferasi sel melalui pengamatan S-phase progression dengan BrdU *incorporation assay*. PGV-0 terbukti mampu menghambat sel T47D dengan IC₅₀ sebesar 10,91 µM lebih baik dibanding kurkumin dengan IC₅₀ 21,61 µM. PGV-0 terbukti pula mampu menghambat proliferasi sel mulai pada konsentrasi 5 µM, sedangkan kurkumin mulai menghambat pada konsentrasi 10 µM. PGV-0 terbukti pula mampu menghambat sel T47D memasuki *S-phase prograssion* pada pengamatan BrdU *incorporation assay*. PGV-0 memiliki potensi antiproliferatif lebih baik dibanding kurkumin.

Kata kunci : PGV-0, antirpoliferatif, *S-phase progression*

Abstract

Breast cancer is the most common cancer occurring in women. Pentagamavunon-0 (2,5-bis-(4'-hidroxy-3'-methoksy)-benzilidine-cyclopentanone: PGV-0), is a curcumin (1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion) analogue that have been proved for its anticancer activity. The aim of this research is to study the antiproliferative effect of PGV-0 on breast cancer cell line, T47D, tested by MTT method. Inhibition ability of this compound evaluated by BrdU incorporation assay. The result of this research shown PGV-0 more potential as cytotoxic agent compare to curcumin by IC₅₀ 11 µM and 22µM respectively. PGV-0 inhibits the cell growth started at 5 µM, and curcumin started at 10 µM. The antiproliferative effect was related to the inhibition of S-phase progression.. The result concludes that PGV-0 more potent than curcumin as antiproliferative agent on breast cancer cell line.

Keywords : PGV-0, antiproliferative, *S-phase progression*

¹ *) Telah dipublikasi di majalah: *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 14 (1), 11-15, 2006

Pendahuluan

Kanker payudara dan leher rahim merupakan dua macam kanker yang frekuensi kejadiannya paling tinggi di antara kanker-kanker jenis lain yang sering menyerang wanita. Hal ini tidak hanya terjadi di suatu tempat saja, namun hampir di seluruh dunia termasuk di Indonesia. Penderita kanker payudara di Indonesia sebanyak 12,10%, terbanyak kedua setelah kanker leher rahim (19,18%) (Tjindarbumi dan Mangunkusumo, 2002). Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita di berbagai belahan dunia yang disebabkan metastasis dari kanker tersebut (Walker *et al.*, 1997; Klauber DeMore, 2001). Mempertimbangkan kondisi tersebut, maka perlu diupayakan pengatasan kanker dengan menghambat dan mematikan pertumbuhan sel kanker secara selektif, disertai usaha meminimalkan efek samping.

Kurkumin (1,7-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion) telah dibuktikan mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dan MCF7 dikaitkan dengan sifat antiestrogeniknya (Verma *et al.*, 1998). Hal ini diperkuat dengan penelitian Shao (2002) yang membuktikan kemampuan kurkumin menghambat pertumbuhan sel MCF7 terinduksi estrogen. Pentagamavunon-0 (2,5-bis-(4'-hidroksi-3'-metoksi)-benzilidin-siklopentanon) dikenal sebagai PGV-0 merupakan analog kurkumin (Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001). Analog tersebut dikembangkan untuk mendapatkan struktur yang lebih stabil dengan aktivitas yang lebih baik dibanding kurkumin. PGV-0 telah dibuktikan mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa (sel kanker serviks), myeloma dan raji (sel kanker burkit limpoma) lebih baik dibanding kurkumin (Da'i, 2003). Berdasarkan fakta tersebut, PGV-0 diharapkan pula mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D. Pada sel ini *p53* mengalami *missense mutation* pada residu 194 (dalam *zinc-binding domain L2*) sehingga *p53* kehilangan fungsinya. Jika *p53* tidak dapat berikatan dengan *response element* pada DNA, maka kemampuannya untuk regulasi *cell cycle* dan apoptosis dapat berkurang atau hilang (Schafer *et al.*, 2000).

Proliferasi sel merupakan fungsi dari program daur sel (Sher, 1996). Daurl sel terdiri dari empat fase yaitu G1 (Gap 1), S (fase sintesis dan replikasi DNA), G2 (Gap 2) dan M (mitosis) (Foster *et al.*, 2001). Penghambatan proliferasi terkait dengan

penghambatan *cell cycle progression*. Kurkumin telah dibuktikan mampu menginduksi *cell cycle arrest* pada fase G1, dan terlihat menurunkan prosentase sel memasuki fase S (Chen dan Huang, 1998; Bharti *et al.*, 2003). Kurkumin telah dibuktikan pula mampu menghambat *cell cycle progression* pada fase G2/M (van Erk *et al.*, 2004). Penghambatan pada fase G1 akan berakibat terhambatnya proses sintesis DNA (fase S). Penelitian ini dilakukan untuk mengamati kemampuan PGV-0 dalam menghambat *S phase progression* pada sel kanker payudara T47D.

Metodologi Penelitian

Bahan

PGV-0 dan kurkumin hasil sintesis sebagai bahan uji telah dielusidasi strukturnya oleh Supardjan (1997) dan Da'i (2003). *Cell line* T47D diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang. Sel ditumbuhkan dalam medium RPMI 1640 (GIBCO BRL) mengandung *growth factor* 10% dan 20% FBS (*Fetal Bovine Serum*)(Sigma Chem. CO. St. Louis. USA).

Cara Penelitian

Uji sitotoksitas metode MTT. Suspensi sel dalam medium RPMI 1640 sebanyak 100 μL dimasukkan ke dalam plate 96 sumuran (per sumuran berisi $1,5 \times 10^4$ sel) dan diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 , 5% (NuaireTM IR autoflow). Sampel ditambahkan dengan ke dalam plate variasi kadar: 100; 50; 25; 10; 5; 2,5 dan 1 μM . Selanjutnya plate diinkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% suhu 37°C . Pada akhir inkubasi, medium pada masing-masing sumuran dibuang dan dicuci dengan PBS, kemudian ditambahkan 100 μL medium baru dan 15 μL MTT 0,5% dalam PBS. Plate diinkubasi 4 jam pada inkubator CO_2 suhu 37°C . Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu formazan. Formazan tidak larut dalam fase air, dilarutkan dengan SDS 10% dalam HCl 0,1 N (E-Merck) dan diinkubasi semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca pada Elisa *reader* (SLT 240 ATC) dengan panjang gelombang 550 nm. Data serapan dikonversi menjadi data % kematian sel.

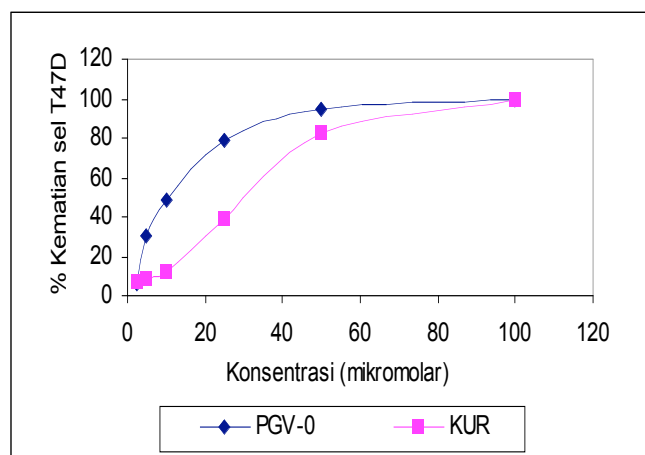
$$\% \text{ kematian sel} : (\text{abs kontrol} - \text{abs perlakuan}) / (\text{abs kontrol} - \text{abs medium}) \times 100\%$$

Uji pengamatan kinetika proliferasi sel, Metode dikerjakan dengan cara yang sama pada uji sitotoksisitas dengan konsentrasi perlakuan 5, 10 dan 20 μM yang diamati pada jam ke-6, -12, -24, -48 dan -72.

Uji inkorporasi BrdU, Sel ditumbuhkan pada *coverslips* dan dianalisis dengan BrdU *incorporation assay kit* (Amersham-Pharmingen-Biotech RPN-202). Sel ditambahkan bromodeoxyuridine (BrdU) selama 30 menit sebelum dipanen pada waktu yang telah ditentukan (setiap 3 jam) dengan konsentrasi 100 μM . Setelah dipanen, kemudian difiksasi dengan buffer glisin (50 mM, pH 2,0 mengandung etanol 70%) dan dicat dengan anti BrdU dan FITC (*fluorescein isothiocyanate*)-*conjugated anti mouse IgG antibody*. Sel yang positif mengandung BrdU dihitung di bawah mikroskop confocal (LSM410, Carl Zeiss) dibandingkan antara sel kontrol dan sel dengan perlakuan setiap 300 sel (Meiyanto, 2001).

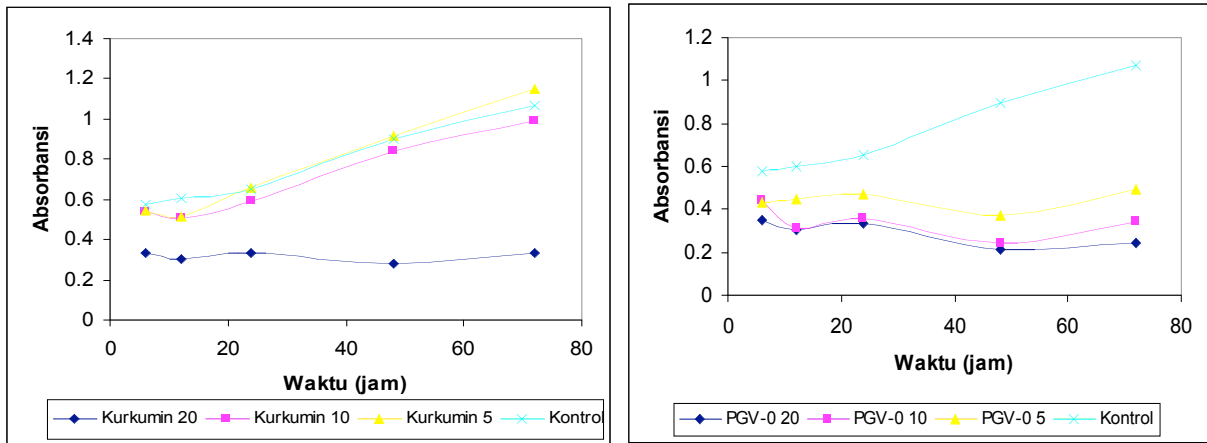
Hasil

Uji sitotoksisitas dan kinetika proliferasi sel dilakukan menggunakan metoda untuk mengetahui potensi PGV-0 sebagai senyawa antiproliferasi terhadap sel kanker T47D. MTT diabsorpsi ke dalam sel hidup dan dipecah melalui reaksi reduksi oleh enzim reduktase dalam rantai respirasi mitokondria menjadi formazan yang terlarut dalam SDS 10% berwarna ungu (Doyle dan Griffiths, 2000). Semakin besar absorbansi menunjukkan semakin banyak jumlah sel yang hidup. Data serapan selanjutnya dikonversi menjadi data prosentase kematian sel. Hasil percobaan dengan analisis probit menunjukkan nilai IC_{50} (konsentrasi penghambatan pertumbuhan 50% sel T47D) PGV-0 11 μM dan kurkumin 22 μM (Gambar 1).



Gambar 1. Grafik hubungan seri konsentrasi kurkumin dan PGV-0 VS persen kematian sel T47D

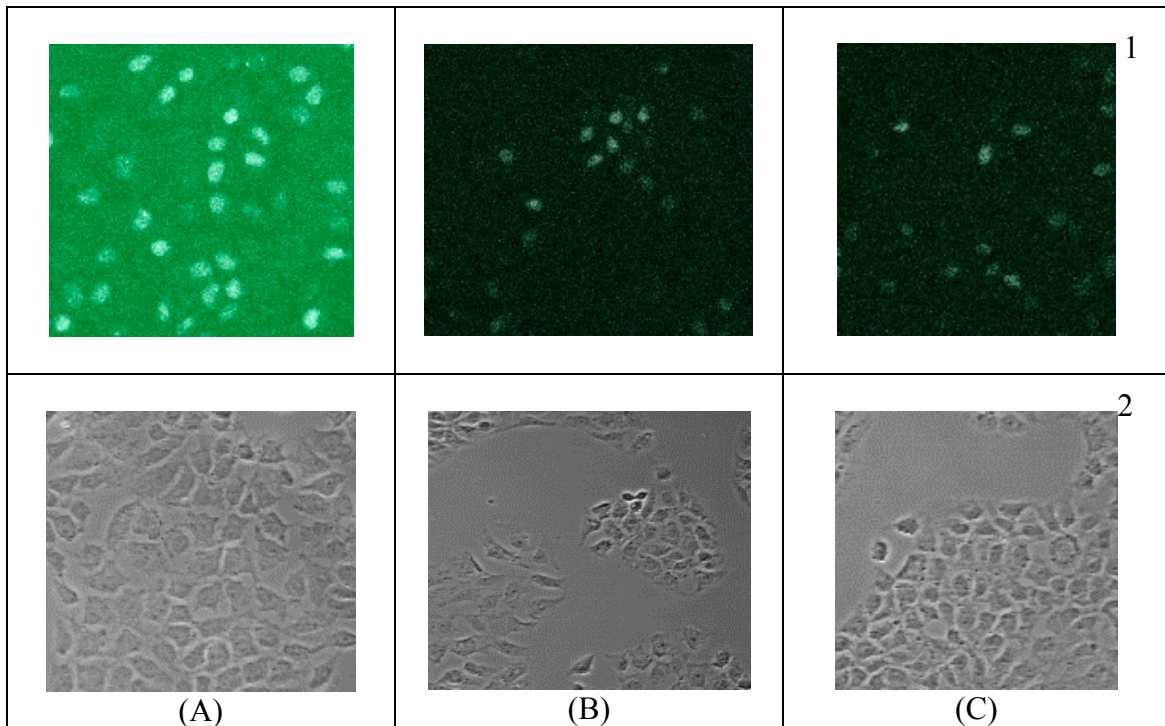
Percobaan proliferasi sel menunjukkan bahwa PGV-0 maupun kurkumin dapat menghambat/ menurunkan sifat proliferaatif sel T47D pada konsentrasi 5 μM . Sedangkan induksi kurkumin mulai konsentrasi 10 μM tidak berpengaruh terhadap tingkat perubahan sel hidup. Hasil tersebut menunjukkan PGV-0 memiliki efek yang lebih kuat untuk menghambat proliferasi sel T47D dibanding kurkumin (Gambar 2)



(A)

(B)

Gambar 2. Profil pertumbuhan sel T47D berdasarkan serapan formazan pengaruh induksi kurkumin (A) dan PGV-0 (B) pada berbagai konsentrasi pada pengamatan berbagai waktu



Gambar 3. BrdU incorporation assay pada sel T47D setelah penagamatan 15 jam. (1) Fluoresen BrdU (+), (2) pengamatan sel tanpa fluoresen, pada perlakuan dengan pelarut sebagai kontrol (A) perlakuan dengan PGV-0 konsentrasi 10 μ M (B) dan perlakuan dengan kurkumin konsentrasi 20 μ M (C)

Untuk mengetahui penghambatan pada program *cell cycle progression* khususnya hambatan memasuki fase S pada sel dilakukan pengamatan dengan *BrdU incorporation assay*. BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) dapat diinkorporasi ke dalam DNA sel pada tempat timidin karena merupakan analog timidin. Sel yang telah terinkorporasi dengan BrdU dapat dideteksi menggunakan monoklonal antibodi BrdU yang dideteksi dengan fluorokrom pada antibodi sekunder. Analisis hasil dari reaksi inkorporasi BrdU bersifat spesifik untuk menunjukkan keberadaan sel pada fase sintesis. Semakin banyak sel mengalami inkorporasi, sel tersebut dominan berada pada fase sintesis DNA (Mourad *et al.*, 1993). Hasil pengamatan menunjukkan jumlah sel yang memasuki fase sintesis (BrdU +) pada sel kontrol tanpa perlakuan sampel sebanyak 50%. Sedangkan pada sel yang diinduksi dengan kurkumin 20 μ M dan PGV-0 konsentrasi 10 μ M berturut-turut BrdU +-nya adalah 11% dan 7% (Gambar 3). Hasil tersebut menunjukkan pada konsentrasi lebih rendah PGV-0 dapat menurunkan prosentase BrdU + lebih besar dibanding kurkumin. Hal ini membuktikan bahwa PGV-0 memiliki kemampuan lebih baik dibanding kurkumin pada penghambatan daur sel untuk memasuki fase sintesis, atau PGV-0 mampu menghambat daur sel pada fase G1.

Pembahasan

Berdasarkan uji sitotoksitas dan pengamatan profil pertumbuhan sel membuktikan bahwa potensi sitotoksik dan penghambatan terhadap proliferasi sel kanker payudara T47D senyawa PGV-0 lebih baik dibanding kurkumin. Daya hambat pertumbuhan tersebut dapat disebabkan karena senyawa tersebut menyebabkan kematian sel atau menghambat program *cell cycle progression* menuju *cell cycle arrest* atau *cell cycle delay*. PGV-0 kemungkinan dapat memacu kematian sel melalui apoptosis atau membuat *cell cycle arrest* sebagaimana kurkumin yang telah diujikan ke beberapa sel kanker (Chen and Huang, 1998; Ramachandran and You, 1999, Verma *et al.*, 1998, Mukhopadhyay, 2001). Analisis inkorporasi BrdU membuktikan bahwa PGV-0 mampu menghambat sel memasuki fase S lebih kuat dibanding kurkumin.

Hambatan tersebut dapat terjadi pada fase G1 (diatur oleh CDK4,6 dan Cyclin D) ataupun pada fase S (diatur oleh CDK 2,4,6 dan Cyclin E) (King, 2000).

PGV-0 dan kurkumin memenuhi ciri-ciri senyawa sebagai penghambat CDK pada umumnya yaitu: (1) Berat Molekul (BM) kurang dari 600, (2) memiliki struktur datar, (3) hidrofobik heterosiklik (4) berinteraksi dengan kinase melalui ikatan hidrofobik (Knockaert *et al.*, 2002). PGV-0 dan kurkumin memiliki ciri BM 350 dan 368 dengan PGV-0 memiliki struktur lebih datar dibanding kurkumin (Tim Molnas, 2001). Hal ini memungkinkan PGV-0 memiliki aktivitas lebih baik dibanding kurkumin. Kemampuan menghambat CDK tersebut memungkinkan PGV-0 mampu menghambat siklus sel khususnya pada fase S.

Hambatan regulasi daur sel oleh kurkumin terjadi melalui penurunan level ekspresi Cyclin D1 yang berakibat pada penghambatan fosforilasi pRb, melalui pembentukan kompleks dengan Cdk4 (Mukhopadhyay *et al.*, 2001; Aggarwal, 2003). Penghambatan fosforilasi pRb berakibat terhentinya daur sel karena E2F tidak terlepas dari ikatan dengan pRb, sehingga sel tidak mampu mentranskrip gen-gen yang diperlukan pada proses daur sel maupun proliferasi sel (Foster *et al.*, 2001; King, 2000). Hal ini dimungkinkan pula merupakan jalur yang sama pada penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara T47D oleh PGV-0. Penurunan ekspresi Cyclin D1 dikaitkan pula dengan kemampuan penghambatan NF- κ B melalui penghambatan I κ B α oleh kurkumin (Shishodia *et al.*, 2003). Penghambatan NF- κ B berakibat pula pada pemacuan apoptosis (program bunuh diri sel) sel kanker (Bharti *et al.*, 2003)

Penghambatan daur sel ini dapat juga disebabkan kemampuan senyawa kurkumin dan PGV-0 untuk meningkatkan ekspresi protein CIP/KIP yaitu p21 waf1 dan p27 kip (Kim *et al.*, 2003; Ramachandran and You, 1999). Protein p21 dan p27 akan membentuk ikatan kompleks dengan CyclinD dan CyclinD Dependent Kinase 4/6 (Cdk), sehingga akan menghambat fosforilasi pRb (protein retinoblastoma). Hal ini mengakibatkan E2F inaktif, hal ini berakibat pada terhentinya daur sel (Foster *et al.*, 2001; King, 2000). Berdasarkan uraian tersebut, perlu dilakukan penelitian lanjut untuk analisis pada aras molekular mekanisme penghambatan pertumbuhan sel kanker oleh PGV-0

Kesimpulan

PGV-0 memiliki potensi penghambatan pertumbuhan terhadap sel kanker payudara T47D lebih baik dibanding kurkumin. PGV-0 mampu memiliki nilai IC50 10,91 μM dan mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara mulai pada konsentrasi 5 μM . Pada konsentrasi 10 μM , PGV-0 menurunkan BrdU + lebih besar dibanding kurkumin.

Ucapan Terima kasih

Penelitian ini didanai oleh Kementerian Riset dan Teknologi RI melalui proyek Riset Unggulan Terpadu X tahun 2004.

Daftar Pustaka

- Aggarwal, B.B., Kumar A., Aggarwal, M.S., and Shishodia, S., 2003, Curcumin derived from Turmeric (*Curcuma longa*): A Apice All seasons, *Phytochemicals in cancer chemoprevention*, 1-24
- Bharti, A.C., Donato, N., Shing, S., and Aggarwal, B.B., 2003, Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor κB and I κB kinase in Human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction apoptosis, *Blood*, 101(3), 1053-1062
- Chen, H.W., and Huang, H.C., 1998, Effect of Curcumin on cell cycle progression and apoptosis in vascular smooth muscle cells, *British Journal of Pharmacology*, 124, 1029-1040
- Da'i, M., 2003, Aktivitas antiproliferatif Pentagamavunon-0 terhadap sel Raji, Sel HeLa dan sel Myeloma, *Thesis*, Program Pascasarjana UGM, Yogyakarta
- Dubois, R.N., Abramson, S.B., Draffod, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., and Lipsky, P.E., 1998, Cyclooxygenase in Biology and Disease, *FASEB J*, 12, 1063-1073.
- Foster, J.S., Henley, D.C., Ahamed, S., and Wimalasena, J., 2001, Estrogens and Daur sel Regulation in Breast Cancer, *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 12(7), 320-327.
- King, R.J.B., 2000, *Cancer Biology*, 2nd ed., Pearson Education Limited, London.
- Kim, J.S., Bae, E.K., Ahn, K.S., Park, S., Kim, B.K., 2003, Biological Effects of Curcumin on Apoptosis in Acute and Chronic Myelogenous Leukemia, *Blood*, 102, 11, 4676

- Klauber-DeMore, N, Zee, KJV, Linkov, I, Borgen, PI, and Gerald, WL, 2001, Biological Behavior of Human Breast Cancer Micrometastases, *Clin. Cancer Res.*, 7, 2434-2439
- Knockaert, M., Greengard, P., and Meijer, L., 2002, Pharmacological inhibitors of cyclin dependent kinases, *Trends*, 23, 9, 417-424
- Meiyanto, E., Hoshijima, M., Ogawa, T., Ishida N., and Takeya, T., 2001, Osteoclast Differentiation Factor Modulates Cell Cycle Machinery and Causes a Delay in S Phase Progression in RAW264 Cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 278-283
- Mourad WA, Connely JH, Sembera DL, *et al.*, 1993, The Correlation of Two Argyrophilic Nucleolar Organizer Region Counting Methods With BrdU Labelling Index: A Study of Metastatic Tumors of the Brain, *Hun Pathol*, 24, 206-10
- Mukhopadhyay, A., Banerjee, S., Stafford, L.J., Xia, C., Liu, M., and Aggarwal, B.B., 2001, Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of cyclin D1 expression and CDK4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation, *Oncogen*, 21(57), 8852-8861
- Ramachandran, C., You, W., 1999, Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin, *Breast Cancer Research and Treatment*, Vol. 54, 3, 269-278
- Schafer, J.M., Lee, E.S., O'Regan, R.M., Yao, K., and Jordan, V.C., 2000, Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice, *Clin. Cancer Res.*, 6, 4373-4380.
- Shishodia, S., Potdar, P., Gairola, C.G., and Aggarwal, B.B., 2003, Curcumin (diferuloylmethane) down regulates cigarette smoke induced NF κ B activation through inhibition of I κ B α kinase in human lung epithelial cells: correlation with suppression of COX-2, MMP-9 and Cyclin D1, *Carcinogenesis*, 24 (7), 1269-1279
- Shao, Z., Shen, Z., Liu, C., Sartippour, M.R., Go, V.L., Heber, D., and Nguyen, M., 2002, Curcumin Exerts Multiple Suppressive Effects on Human Breast Carcinoma Cells, *Int. J. Cancer*, 98, 234-240
- Sher, C.J., 1996, Cancer Cell Cycles, *Science*, **274**, 1672-1676.
- Supardjan, A.M., Jennie, U.A., Samhoedi, M., Timmerman, H., and van der Goot, H., 1997, Synthesis and Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Some 4-Alkylcurcumin Derivatives, in *Recent Development in Curcumin Pharmacochimistry*, Proceedings of The International Symposium on Curcumin Pharmacochimistry (ISCP), August 29-31, 1995, edited by Suwijyo Pramono *et al.*, Aditya Media, Yogyakarta Indonesia

- Tjindarbumi, D. and Mangunkusumo, R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol.*, 32(Supplement 1), S17-S21
- Tim Molnas Fak. Farmasi UGM, 2001, *Buku III, Laporan Penelitian Bidang Farmakologi Proyek Molnas*, Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- van Erk, M.J, Teiling, E., Stall, Y.C.M., Hubers, S., van Bladeren, P.J., Aarts, J. MMJG., van Ommen, B., 2004, Time and Dose dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer, *J Carcinog*, 3, 1-17
- van der Goot H, 1997, The chemistry and qualitative structure-activity relationships of curcumin, in *Recent Development in Curcumin Pharmacology*, Proceedings of The International Symposium on Curcumin Pharmacology (ISCP), August 29-31, 1995, edited by Suwijyo Pramono, Aditya Media, Yogyakarta Indonesia.
- Verma, Surendra P., Goldin, Barry R., and Lin, Peck S., 1998, The Inhibition of the Estrogenic Effects of Pesticides and Environmental Chemicals by Curcumin and Isoflavonoids, *Environmental Health Perspectives*, **106**(12), 807-812.
- Walker, R.A., Jones, J.L., Chappel, S., Walsh, T., and Shaw, J.A., 1997, Molecular Pathology of Breast Cancer and Its Application To Clinical Management, *Cancer and metastasis Rev.*, 16, 5-27.