

PENTAGAMAVUNON-1 MENGHAMBAT SIKLUS SEL T47D TERINDUKSI CASPASE INHIBITOR Z-VAD-Fmk PADA FASE G₂-M

Muhammad Da'i*, Supardjan A.M.**, Umar Anggara Jenie**,
Kawaichi M.***, Edy Meiyanto**

*Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, ** Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, *** Graduate School of Biological Science Nara Institute Science and Technology

Korespondensi: Dr. Muhammad Da'i, M.Si., Apt.
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jln. Ahmad Yani Tromol
Pos 1, Pabelan, Kartasuro, Surakarta 57162, email: abulathfi@gmail.com

ABSTRACT

Previous experiment indicated Curcumin's analogue Pentagamavunon-1 (2,5-bis(4¹-hidroksi-3¹,5¹-dimethyl)-benzilidide-cyclopentanone) has inhibitory activity on T47D cell proliferation through induction of apoptosis and cell cycle arrest at G₂-M phase. This research was conducted to observe the relationship between the induction of apoptosis and inhibition of cell cycle in T47D cells induced by Pentagamavunon-1 (PGV-1). The T47D cells were treated with 2.5 PGV-1 μM; Z-VAD-Fmk 2.5 μM; (Z-VAD-Fmk 2.5 μM+PGV-1 2.5 μM). Kinetics of cell proliferation was observed with flowcytometer analysis, molecular expression was observed with Western blot methods. The results showed induction of PGV-1 and Z-VAD-Fmk stimulate the accumulation of cells in G₂-M phase (39.28%), did not differ significantly with cells that induced by PGV-1 only (34.19%). Molecular analysis showed that treatment with (PGV-1+Z-VAD-Fmk) could prevent apoptosis through inhibition of activation of Caspase-3, increased the expression of p21 and activated Cdc-2. Overall the study showed inhibition of cell cycle at G₂M phase by PGV-1 compound is not affected by the activation of caspase-3.

Keywords: Pentagamavunon-1, apoptosis, cell cycle arrest, G₂-M phase

ABSTRAK

Analog kurkumin Pentagamavunon-1 (2,5-bis(4¹-hidroksi-3¹,5¹-dimetil)-benzilidinsiklopentanon) telah diteliti dapat menghambat proliferasi sel melalui mekanisme induksi apoptosis dan *cell cycle arrest* pada fase G₂-M. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati keterkaitan antara proses induksi apoptosis dan penghambatan siklus sel pada sel T47D yang diinduksi senyawa Pentagamavunon-1 (PGV-1). Sel T47D diberi perlakuan PGV-1 2,5 μM; Z-VAD-Fmk 2,5 μM dan (Z-VAD-Fmk 2,5 μM+PGV-1 2,5 μM). Kinetika proliferasi sel diamati dengan analisis *flowcytometric*, ekspresi molekuler diamati dengan metode *Western blot*. Hasil pengamatan menunjukkan induksi (PGV-1+Z-VAD-Fmk) memacu akumulasi sel pada fase G₂-M (39,28%) tidak berbeda signifikan dengan sel yang hanya diinduksi PGV-1 (34,19%). Pengamatan molekuler menunjukkan perlakuan (PGV-1+Z-VAD-Fmk) mencegah terjadinya apoptosis melalui penghambatan aktivasi Caspase-3. Secara keseluruhan penelitian menunjukkan penghambatan siklus sel pada fase G₂-M oleh senyawa PGV-1 tidak tergantung oleh aktivasi Caspase-3.

Kata kunci: Pentagamavunon-1, apoptosis, penghambatan siklus sel, fase G₂-M

PENDAHULUAN

Desain senyawa analog dan turunan kurkumin telah banyak dilakukan, diantaranya dengan modifikasi gugus beta diketon kurkumin menjadi analog monoketon siklik (1,2). Diantara analog tersebut antara lain adalah senyawa PGV-1. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan senyawa PGV-1 memiliki potensi lebih kuat dibanding analog kurkumin PGV-0 (pentagamavunon-0) dan kurkumin dengan nilai berturut IC_{50} 1,74 μ M, 9,39 μ M dan 24,97 μ M (3). Hasil tersebut menunjukkan Kedua analog siklik monoketon tersebut memiliki potensi lebih kuat dibanding kurkumin dengan dan PGV-1 memiliki potensi terbesar dalam menghambat pertumbuhan sel T47D.

Penelitian lanjutan menunjukkan PGV-1 menghambat proliferasi sel T47D melalui proses induksi apoptosis melalui aktivasi caspase 3/7 dan *cell cycle arrest* pada fase G_2 -M hiperploidi sel (4,5). Mekanisme tersebut menimbulkan dugaan PGV-1 memiliki aksi menyerupai senyawa obat-obat antimikrotubul (*Antimicrotubule drug*: AMD) pada proses penghambatan proliferasi sel (5).

Pada proses apoptosis seringkali terjadi akumulasi sel pada fase G_2 -M karena Wee1 dan Myt yang memfosforilasi Cdc-2 merupakan substrat dari Caspase-3 (6). Hal ini mengindikasikan adanya keterkaitan antar penghambatan siklus sel dengan proses apoptosis. Untuk itu perlu dilakukan penelitian hubungan penghambatan siklus sel T47D khususnya pada fase G_2 -M dengan proses apoptosis pada induksi sel T47D dengan PGV-1. Penelitian dilakukan dengan mengkombinasikan PGV-1 dengan inhibitor Caspase universal Z-VAD-Fmk (7)

METODE PENELITIAN

Bahan

PGV-1 diperoleh dari Tim Molnas UGM. Sel T47D merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC) Fak Farmasi UGM yang diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya dan Prof. Masashi Kawaichi (Lab Onkologi, NAIST) dikultur dalam medium DEMEM (GIBCO BRL). Medium penumbuh yang mengandung 10.000 U/ml penisilin/streptomisin dengan 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Sigma Chem. CO. St. Louis. USA). Pelarut senyawa uji adalah DMSO (Sigma).

Bahan lain yang digunakan: natrium karbonat (E.Merck), fungison dan antibiotik penisilin dan streptomisin (Sigma Chem. CO. St. Louis. USA), hepes dan tripsin (Sigma Chem. CO. St. Louis. USA). Antibodi untuk analisis protein-protein: p21 (Abcam), cdc-2 (Cell Signalling), *cleavage* Caspase-3 (Cell Signalling), *cleavage* PARP (Cell Signalling), α -tubullin (Sigma).

Alat

Tangki nitrogen cair, mikroskop fluoresensi, mikroskop fase kontras (Olympus, Jepang), penangas air, sentrifuge Sigma 3K12 (B.Braun Biotech International), inkubator CO_2 Jacketed Incubator (NuairTM IR autoflow), ELISA reader, hemositometer (New Bauer), tabung konikal steril (nunclone), *scraper*, *tissue culture flask* (nunclone), ampul, *laminar airflow* (Nuair), pH meter (Toa Electrics Ltd), mikroplate 96 sumuran (Nunclone), mikropipet (Soccorex), vorteks (Genie), Timbangan elektrik (Sartorius).

Cara Kerja

Analisis flowcytometric: Sel diinduksi dengan perlakuan PGV-1, Z-VAD-Fmk (Sigma), Z-VAD-Fmk dan PGV-1 dengan konsentrasi tertentu dan diinkubasi selama 24 jam, sel dicuci

dengan PBS dan ditambahkan dengan larutan propidium idodide 500 µL (PI; 50 µg/mL dalam PBS mengandung 0,1% Triton-X). Sel selanjutnya diberi perlakuan RNA-se bebas-DNase(20 µg/mL) selama 10 menit pada suhu 37°C. Sel dianalisis dengan FACS Calibur dimasukkan pada alat *flow cytometry*.

Analisis ekspresi gen: Dilakukan dengan metode *Western blot*, untuk mengamati protein p21, cdc-2, Caspase-3, cleavage PARP, semua anti bodi primer diencerkan dengan perbandingan (1:1000). Sel dicuci dengan PBS dingin kemudian ditambahkan buffer lisis (0,5% NP-40, 50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM fenilmetilmefonil fuorida), 10 µg/ml N-tosyl-L-fenilalanin klorometil keton, 10 µg/ml *Soybean* tripsin inhibitor). 10 µg lisat protein dipisahkan pada 10, 12, dan 15 % SDS-PAGE dan ditransfer pada membran PVDF (Nacalai) pada tegangan listrik 20 volt permembran selama satu jam. Membran kemudian diinkubasi dalam 10 ml larutan PBST

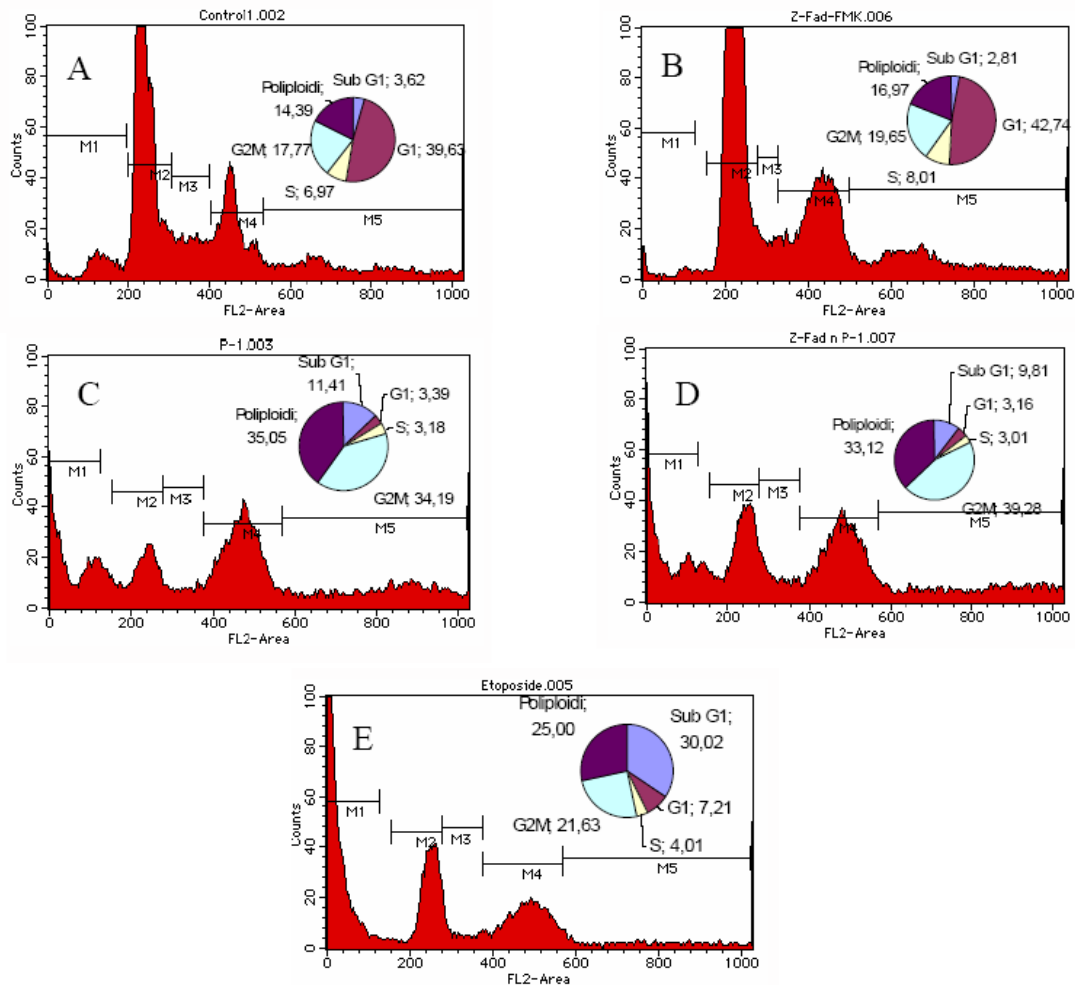
(PBS + Tween-20 0,1%) yang mengandung antibodi tertentu selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya dicuci dengan PBST dan diinkubasi dengan antibodi sekunder terkonjugasi horshedish peroksidase. Subtrat digunakan ECL (*Enhancer Chemiluminesence*) ataupun ECL plus (Amersham), pengamatan menggunakan film.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis *flowcytometric* menunjukkan bahwa perlakuan PGV-1 dan Z-VAD-Fmk dengan konsentrasi masing-masing 2,5 µM dapat menghambat siklus sel dengan memacu akumulasi sel pada fase G₂-M (39,28%). Fenomena yang sama dijumpai pada perlakuan sel dengan PGV-1 2,5 µM, yang menunjukkan akumulasi sel pada fase G₂-M sebesar 34,19%. Kedua perlakuan tersebut diikuti dengan munculnya akmulai hiperploidi sel. Perlakuan dengan Z-VAD-Fmk 2,5 µM menunjukkan kinetika proliferasi sel sama dengan sel kontrol (Gambar 1, Tabel 1).

Tabel 1. Hasil analisis *flowcytometric* pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1, PGV-1 dan terinduksi Z-VAD-Fmk dibanding kontrol, dan perlakuan dengan etoposide, inkubasi dilakukan selama 24 jam.

Perlakuan Uji		M1	M2	M3	M4	M5
		Sub G ₁	G ₁	S	G ₂ -M	Hiperploidi
Kontrol Jam 0	Rata-rata	3,62	39,63	6,97	17,77	14,39
	SD	0,85	4,56	2,22	3,94	3,39
Z-VAD-Fmk 2,5 µM	Rata-rata	2,81	42,74	8,01	19,65	16,97
	SD	1,02	3,27	3,77	2,39	4,00
PGV-1 2,5 µM	Rata-rata	11,41	3,39	3,18	34,19	35,05
	SD	4,83	2,34	2,43	9,78	17,42
Z-VAD-Fmk + PGV-1 2,5 µM	Rata-rata	9,81	3,16	3,01	39,28	33,12
	SD	5,10	2,27	2,49	4,83	14,87
Etoposide 2,5 µM	Rata-rata	30,02	7,21	4,01	21,63	25,00
	SD	7,89	1,59	0,74	7,75	19,07



Gambar 1. Perlakuan PGV-1 pada sel T47D menghambat siklus sel pada fase G₂-M (C), hal tersebut terjadi pula pada sel dengan perlakuan PGV-1 bersama-sama Z-VAD-Fmk (D). Sel kontrol tanpa perlakuan (A) dan sel terinduksi Z-VAD-Fmk (B) menunjukkan distribusi sel dalam berbagai fase siklus sel yang sama. Mekanisme penghambat pertumbuhan relatif berbeda dengan perlakuan menggunakan etoposide 2,5 μ M, sel terakumulasi pada fase sub G₁ (E). Inkubasi sel dengan senyawa uji dilakukan selama 24 jam. Hasil merupakan representasi 3X percobaan

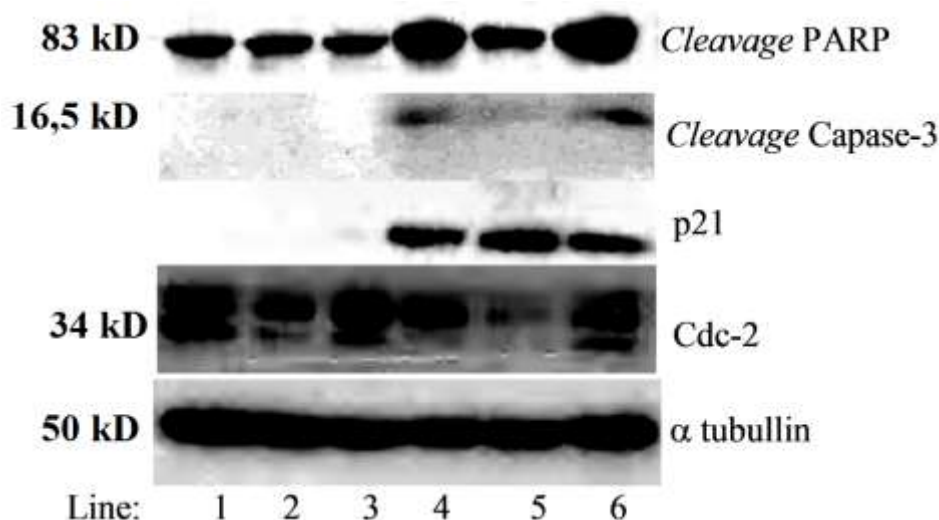
Hasil tersebut menunjukkan aktivasi ataupun penghambatan aktivitas Caspase tidak berpengaruh terhadap kemampuan PGV-1 dalam menghambat siklus sel. Etoposide merupakan senyawa yang dikenal sebagai penginduksi apoptosis digunakan sebagai kontrol positif menunjukkan terjadinya proses apoptosis dan tidak menunjukkan adanya penghambatan sel pada fase G₂-M dan akumulasi hiperploidi sel.

Analisis molekuler dilakukan terhadap protein-protein yang terlibat pada fase G₂-M yaitu Cdc-2 dan p21 dan protein penanda aktivasi Caspase-3 (*cleavage* Caspase-3) dan penanda apoptosis (*cleavage* PARP). Cdc-2 merupakan kinase yang mengatur siklus sel pada fase G₂-M. Kinase Wee1 dan Myt1 dapat menginaktivkan Cdc-2 melalui proses fosforilasi, keduanya merupakan substrat Caspase (6). Aktivasi Caspase

dapat memacu terjadinya aktivasi Cdc-2 dan memacu sel memasuki fase mitosis.

Analisis molekuler terhadap protein p21 dengan metode *Western blot* menunjukkan bahwa induksi PGV-1 2,5 μ M bersama-sama dengan Z-VAD-Fmk 1,0 dan 2,5 μ M menunjukkan peningkatan ekspresi protein p21. Peningkatan ekspresi protein p21 tersebut sama dengan perlakuan PGV-1 pada sel. Induksi Z-VAD-Fmk tidak mempengaruhi proses fosforilasi Cdc-2 pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1 (Gambar 2). Hal tersebut mempertegas hasil analisis

flowcytometric yang menunjukkan terjadinya akumulasi sel pada fase G₂-M dan diikuti hiperploidi pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1 dengan ataupun tanpa induksi Z-VAD-Fmk. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan aktivasi Cdc-2 dapat memacu terjadinya apoptosis (8, 9, 10). Penelitian lain menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 merupakan terminal efektor proses apoptosis (11, 12). Hal ini menunjukkan bahwa aktivasi Cdc-2 dapat berperan sebagai penyebab maupun sebagai konsekuensi proses apoptosis.



Gambar 2. Analisis *Western Blot* terhadap beberapa protein penanda apoptosis dan regulator siklus sel pada fase G₂-M, Z-VAD-Fmk 2,5 μ M menghambat aktivasi Caspase-3 dan *cleavage* PARP pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1 2,5 μ M. Induksi Z-VAD-Fmk tidak mempengaruhi ekspresi protein p21 dan Cdc-2 terdefosforilasi tirosin 15 pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1. Hasil merupakan representasi 2X percobaan. Jumlah protein untuk dianalisis disetarakan dengan menggunakan α -tubulin sebagai kontrol.

Keterangan: *Line* 1. Kontrol, 2. Z-VAD-Fmk 1,0 μ M, 3. Z-VAD-Fmk 2,5 μ M, 4. Z-VAD-Fmk 1,0 μ M+PGV-1 2,5 μ M, 5. Z-VAD-Fmk 2,5 μ M+PGV-1 2,5 μ M, 6. PGV-1 2,5 μ M

Induksi Z-VAD-Fmk 1,0 μ M dan PGV-1 2,5 μ M belum dapat menghambat apoptosis pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1. Hal ini ditunjukkan dengan masih

ditemukannya ekspresi *cleavage* Caspase-3 dan *cleavage* PARP. Z-VAD-Fmk konsentrasi 2,5 μ M bersama PGV-1 2,5 μ M terlihat dapat menghambat aktivasi Caspase-3 dan

mencegah terjadinya *cleavage* PARP. Hasil ini agak berbeda dengan data *flowcytometric* yang menunjukkan perlakuan PGV-1 bersama-sama Z-VAD-Fmk menghasilkan jumlah sel pada fase sub G₁ 9,81% lebih rendah pada sel dengan perlakuan PGV-1 saja (11,41%), namun berbeda signifikan dengan sel kontrol (3,42%). Data ini menunjukkan bahwa populasi sub-G₁ kemungkinan menunjukkan adanya mekanisme kematian lain pada sel T47D dengan perlakuan senyawa uji di samping mekanisme apoptosis melalui aktivasi Caspase-3. Induksi apoptosis dimungkinkan melalui mekanisme lain oleh senyawa antimikrotubul tanpa melalui aktivasi Caspase melalui pelepasan sitokrom C (13). Mekanisme apoptosis independen Caspase ditunjukkan pula melalui protein mitokondrial lain seperti endonuklease G maupun Apoptosis Inducing Protein (AIP) (14, 15).

Hasil uji secara keseluruhan menunjukkan penghambatan siklus sel dan induksi apoptosis menunjukkan bahwa PGV-1 mampu menghambat siklus sel, menimbulkan akumulasi sel pada hiperploidi yang selanjutnya akan mengalami apoptosis. Mekanisme kematian kemungkinan melibatkan pula mekanisme kematian lain yang dikenal dengan *mitotic catastrophe*. Kedua mekanisme kematian tersebut menunjukkan karakteristik terjadinya fragmentasi inti sel. Penambahan penghambat Caspase Z-VAD-Fmk yang merupakan inhibitor Caspase, menunjukkan bahwa fragmentasi terhadap inti sel tidak hanya disebabkan mekanisme apoptosis pada sel uji. Hal ini terlihat dari penurunan persentase sub-G₁ pada sel dengan perlakuan PGV-1 bersama Z-VAD-Fmk dibanding dengan perlakuan PGV-1 hanya sebesar 1,60%.

Perlakuan PGV-1 2,5 µM terhadap sel kanker payudara T47D mampu menghambat regulasi siklus sel pada fase G₂-M dan mitosis. Akumulasi sel

hiperploid dan aktivasi Cdc-2 oleh PGV-1 2,5 µM pada sel kanker payudara T47D mengindikasikan senyawa tersebut menghambat pertumbuhan sel T47D melalui mekanisme sebagai senyawa antimikrotubul (16,17). Kegagalan terjadinya mitosis yang sempurna yang ditunjukkan dengan tidak adanya sel yang memasuki fase G₁ normal, memacu terjadinya aktivasi Caspase-3 dan terjadinya *cleavage* PARP sebagai indikasi apoptosis.

Beberapa penelitian menunjukkan perlakuan dengan senyawa antimikrotubul memodulasi sel keluar dari fase mitosis tanpa diikuti dengan pemisahan kromosom dan pemisahan sel secara sempurna, hal ini dikenal sebagai kelainan mitosis (*aberrant mitotic/ mitotic slippage*) (18, 19). Hal ini mengakibatkan sebagian sel yang telah memasuki fase G₂-M (4N) tetap melanjutkan siklus selnya dan mengalami endoreduplikasi sehingga menyebabkan sel mengalami hiperploidi (18). Akumulasi sel pada G₂-M dan "seperti" G₁ ini selanjutnya memacu sel untuk mengalami apoptosis (16). Beberapa peneliti menunjukkan terjadinya kematian sel ditandai dengan hiperploidi dan aktivasi Cdc-2 dikenal sebagai mekanisme kematian *mitotic catastrophe*, sebagai akibat kelainan mitosis.

KESIMPULAN

1. Induksi sel T47D dengan PGV-1 2,5 µM bersama dengan inhibitor caspase Z-VAD-Fmk 2,5 µM memacu terjadinya penghambatan siklus sel pada fase G₂-M dan hiperploidi sel.
2. Proses penghambatan siklus sel T47D oleh PGV-1 2,5 µM pada fase G₂-M tidak tergantung pada aktivasi caspase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Mrs. Sachiko Iida (Iida Foundation) yang telah memberikan dukungan dana untuk pelaksanaan penelitian di NAIST (Japan)

DAFTAR PUSTAKA

1. Suwijyo P (editor). Recent Development in Curcumin Pharmacology. Proceedings of The International Symposium on Curcumin Pharmacology (ISCP), August 29-31, 1995. Yogyakarta: Aditya Media; 1997.
2. Adams BK, Ferstl EM, Davis MC, Herold M, Kurtkaya S, Camalier RF, Hollingshead MG, Kaur G, Sausville EA, Rickles FR, Snyder JP, Liotta DC, Shojia M. Synthesis and Biological Evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorg Med Chem* 2004; 12:3871–3883.
3. Da'i M, Supardjan AM, Meiyanto E, Jenie UA. Geometric isomers and cytotoxic effect on T47D cells of curcumin analogues PGV-0 and PGV-1. *Majalah Farmasi Indonesia* 2007; 18(1): 40-47.
4. Da'i M, Meiyanto E, Supardjan AM, Jenie UA, Kawaichi M. Potensi antiproliferasi analog kurkumin pentagamavunon terhadap sel kanker payudara T47D. *Artocarpus* 2007; 7(1): 14-20.
5. Da'i M, Jenie UA, Supardjan AM, Kawaichi M. T47D cells arrested at G2M and hyperploidy formation induced by a curcumin's analogue PGV-1. *Indonesian Journal Of Biotechnology* 2007; 12(2): 1005-1012.
6. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 821-846.
7. Srivastava RK, Srivastava AR, Korsmeyer SJ, Nostrova M, Cho-Chung YS, Longo DI. Involvement of microtubules in the regulation of Bcl-2 phosphorylation and apoptosis through C-Amp-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3509-3517.
8. Donaldson KL, Goolsby GL, Kiener PA, Wahl AF. Activation of p34cdc2 Coincident with taxol-induced apoptosis. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 1041.
9. Huang TS, Shu CH, Yang WK, Whang-Peng J. Activation of Cdc 24 phosphatase and Cdc 2 kinase involved in GL331 induced apoptosis. *Cancer Res* 1997; 57: 2974-2978.
10. Ibrado AM, Kim CN, Bhalla K. Temporal relationship of Cdk1 activation and mitotic arrest to cytosolic accumulation of cytochrome C and caspase-3 activity during taxol-induced apoptosis of human Aml HL-60 cells. *Leukemia* 1998; 12: 1930-1936.
11. Harvey KJ, Blomquist JF, Ucker DS. Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2 caspase and cyclin dependent kinase activities. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2912-2922.
12. Levkau B, Koyama HM, Raines EW. Cleavage of p21 Cip1/Waf1 and p27 Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: Role of caspase cascade. *Mol Cell* 1998; 1: 553-563.
13. Huisman C, Ferreira CG, Broker LE, Rodriguez JA, Smit EF, Postmus PE, Kruijff FA, Giaccone G. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small lung cancer cell line NCI-H460. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 596-606.
14. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G (Endo G) is an apoptotic dna-se when release from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-99.
15. Lipton SA, Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* 2002; 111: 147-150.
16. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer* 2000; 11: 2619-2622.
17. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptosis and non apoptotic death in tumour cells. *Cancer* 2004; 4: 592-603.

18. Di Leonardo A, Khan SH, Linke SP, Greco V, Seidita G, Wahl GM. DNA relocation in the presence of mitotic spindle inhibitors in human and mouse fibroblast lacking either p53 or pRb function. *Cancer Res* 1997; 57: 13692-13697.
19. El-Hajouji A, Cunha M, Kirsch-Volders M. Spindle poison can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleates in the cytokineses block assay. *Mutagenesis* 1998; 13: 193-198.