

Potensi Antiproliferative Analog Kurkumin Pentagamavunon Terhadap Sel Kanker Payudara T47D*)

Muhammad Da'i^{3**}, Edy Meiyanto^{1**}, Supardjan AM¹, Umar Anggara Jenie¹, Mashasi Kawaichi²

*) Artikel ini merupakan bagian dari disertasi program S3 Farmasi di Universitas Gadjah Mada (UGM)

***) Cancer Chemoprevention Research Center Fak Farmasi UGM

1. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Jogjakarta
2. Laboratorium Animal Gene, Bioscience Graduate School Nara Institute Science and Technology Japan
3. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Abstrak

Untuk meningkatkan stabilitas dan aktivitas kurkumin, disintesis dan dikembangkan analog kurkumin pentagamavunon-0 (PGV-0) dan pentagamavunon-1 (PGV-1). Kedua senyawa diharapkan memiliki aktivitas antikanker. Kurkumin dan analognya diuji aktivitas penghambatan terhadap sel kanker payudara T47D dengan pengamatan profil pertumbuhan sel menggunakan metoda MTT. Induksi apoptosis oleh senyawa uji diamati dengan metoda pengecatan ganda menggunakan etidium bromide-acridin orange dan DAPI. Pengamatan terhadap protein regulator apoptosis dilakukan dengan menggunakan metoda *western blot* terhadap caspase-3 dan substratnya (PARP). PGV-1 2,5 μ M terbukti memiliki aktivitas paling kuat dalam menghambat pertumbuhan sel. Kurkumin dan analognya mampu menginduksi terjadinya apoptosis melalui aktivasi caspase-3 dan menghasilkan cleavage PARP. Hasil menunjukkan PGV-1 memiliki potensi menjanjikan untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker.

Kata kunci : Analog kurkumin, anti-kanker, apoptosis

Abstract

Pentagamavunon-0 (PGV-0) and pentagamavunon-1 (PGV-1) have been synthesized and developed to increase the stability and activities as curcumin analogues. Both of compound are hoped to possess anti-cancer activity. Curcumin and its analogues were observed the effect on T47D cells growth by observing growth profile of the cells. The MTT method was used to observe the growth profile of T47D cells induced by the compounds. Apoptosis cells (induced by the compounds) were observed by using double staining (ethidium bromide and acrydine orange) and DAPI staining. The protein of apoptosis regulators were examined by using western blot method to caspase-3 and the substrate PARP. The result indicated that PGV-1 2.5 μ M has the strongest inhibitory effect to T47D cells. Curcumin and its analogues have ability to induce apoptosis via caspase-3 activation and resulted PARP cleavage. Taken together, PGV-1 perform the best potency to be developed as anti-cancer agent.

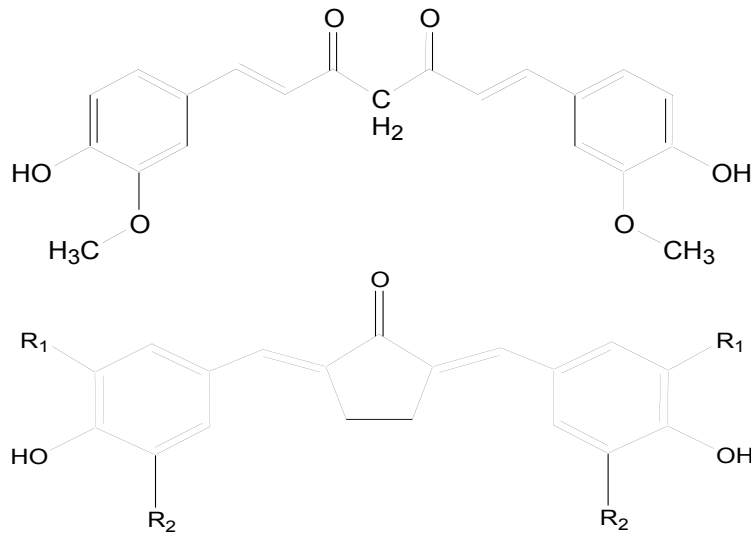
Key words : Curcumin analogues, anti-cancer, apoptosis

Salinan naskah yang dipublikasikan di : *Artocarpus* 7(1):14-20, 2007

Pendahuluan

Kanker payudara memiliki frekuensi kejadian yang tinggi diantara penyakit 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%) (1). Kanker payudara merupakan penyebab utama kematian pada wanita pada berbagai belahan dunia, disebabkan oleh metastasis dari kanker tersebut (2,3).

Aktivitas farmakologis kurkumin telah banyak diteliti dan menunjukkan pula aktivitas antikanker dengan mekanisme molekuler yang kompleks (4). Riset aktivitas antikanker kurkumin telah diteliti sebelumnya dan menunjukkan kemampuan kurkumin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan daur sel dan dapat memacu terjadinya apoptosis sebagaimana *review* (5).



**Gambar 1. Struktur kurkumin dan pentagamavunon (PGV). Tanda panah menunjukkan tempat gugus ikatan rangkap yang memungkinkan PGV memiliki tiga jenis isomer geometrik yang berbeda yaitu: *E-E*, *Z-Z* dan *E-Z*.
Keterangan: PGV-0 ($R_1=OCH_3$, $R_2=H$), PGV-1 ($R_1=R_2=CH_3$)**

Kurkumin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dan MCF7 dikaitkan dengan sifat antiestrogeniknya (6). Hal ini diperkuat dengan penelitian Shao *et al.* (2002) (7) yang membuktikan kemampuan kurkumin menghambat pertumbuhan sel MCF7 terinduksi estrogen. Induksi apoptosis oleh kurkumin pada sel kanker payudara MDA-MB-468 disebabkan kemampuan menghambat aktivitas Akt/PKB (protein kinase B) (8). Kurkumin terbukti pula menginduksi apoptosis sel kanker payudara MCF-7 melalui peningkatan ekspresi p53 dan Bax (9), demikian pula pada pengamatan apoptosis terhadap sel kanker payudara T47D (10). Hal tersebut membuktikan kurkumin memiliki potensi sebagai pemacu apoptosis pada sel kanker payudara.

Kurkumin merupakan senyawa yang tidak stabil pada pH diatas 6,5 dan pengaruh cahaya (11, 12). Berdasarkan pertimbangan tersebut, dilakukan perubahan gugus β diketon pada kurkumin menjadi analog gugus monoketon. Analog monoketon yang dikembangkan antara lain adalah pentagamavunon 0 (2,5-*bis*(4¹-hidroksi-3¹-metoksi)-benzilidin-siklopentanon dikenal sebagai PGV-0 dan pentagamavunon-1 (2,5-*bis*(4¹-hidroksi,3¹,5¹-dimetil)-benzilidin-siklopentanon dikenal sebagai PGV-1 (Gambar 1) (13). Modifikasi tersebut dilakukan untuk meningkatkan aktivitas dan stabilitas analog kurkumin.

Penelitian pendahuluan terhadap aktivitas antiproliferatif PGV-0 terhadap sel T47D telah dibuktikan memiliki potensi lebih baik dibanding kurkumin baik melalui pemacuan apoptosis maupun penghambatan pertumbuhan sel (10). PGV-1 memiliki pengaruh yang sama terhadap induksi apoptosis terhadap sel T47D yang diinduksi estrogen (14). Penelitian ini dilakukan untuk menentukan potensi antiproliferatif PGV-0

dan PGV-1 pada proses induksi apoptosis khususnya analisis molekular awal terhadap protein penanda apoptosis yaitu PARP *cleavage*.

Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), telah diteliti sebelumnya sebagai penanda terjadinya proses apoptosis dengan terjadinya *cleavage* dengan berat molekul 89 kda dan 24 kda dari semula 116. Caspase-3 yang diaktifkan selama proses apoptosis merupakan caspase yang bertanggung jawab terhadap terjadinya *cleavage* PARP tersebut (15,16,17). Terjadinya *cleavage* PARP dan *cleavage* caspase-3 merupakan penanda terhadap terjadinya apoptosis pada sel yang diinduksi dengan senyawa uji.

Bahan dan Alat

Senyawa PGV-0 dan PGV-1 diperoleh dari Tim Molnas UGM. Senyawa pembanding adalah kurkumin (Merck Schuchardt).

Cell line T47D diperoleh dari Prof. Tatsuo Takea, Nara Institute of Science and Technology (NAIST), Jepang), medium DMEM. Medium penumbuh mengandung *growth factor* 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*), 0,5 % fungison dan 2 % antibiotik penisilin dan streptomisin (GIBCO). Bahan lain yang digunakan: DMSO, natrium karbonat (E.Merck), kertas saring 0,2 μ m, akuades, hepes, dan tripsin (Sigma), *Phospat Buffered Saline* (PBS), larutan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida) 5 mg/mL PBS, larutan *sodium dodecyl sulphate* (SDS) 10 % dalam HCl 0,01 N. Untuk analisis western blot digunakan membrane PVDF (Nacalai).

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah, mikroskop fluoresensi (Zeiss MC 80), mikroskop fase kontras (Olympus), penangas air, sentrifus Sigma 3K12 (B. Braun Biotech International), inkubator CO₂ (NuairTM IR autoflow), *Laminar air*

flow cabinet (Nuair), *ELISA reader* (SLT 240 ATC), *hemocytometer* (Nebauer), tabung *conical* steril (Nunclone), *tissue culture flask* (Nunclone), *plate*(Nunclon), pH meter (Toa Electrics Ltd), mikrolate 96 sumuran (Nunclone), mikropipet (Gilson), kamera digital (Canon Power Shoot A 80, 4,0 mega pixels). Untuk analisis western blot digunakan protein transfer BioRad, dan elektroforesis SDS page (Atto)

Uji pengamatan profil pertumbuhan sel T47D, Suspensi sel dalam medium DEMEM sebanyak 100 μl (kepadatan 5×10^3 sel/sumuran) dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran berbeda dan *plate* diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO_2 5%. Kemudian ditambahkan sampel 100 μl dalam medium pada tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir sampel dengan variasi kadar tertentu (PGV-1: 2,5 μM , PGV-0: 5,0 μM kurkumin: 10,0 μM) dengan waktu perlakuan 6, 12, 24, 48, 72. Selanjutnya *plate* diinkubasi dalam inkubator CO_2 5% selama 48 jam pada 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 lagi selama 6 jam pada suhu 37°C . Sel hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk formazan yang berwarna ungu. Formazan dilarutkan dalam larutan SDS, lalu diinkubasi selama 12 jam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Pengamatan Apoptosis Sel (kepadatan $1,5 \times 10^4$ sel/sumuran) ditanam pada *coverslips* dalam *plate* 24 sampai 50 % konfluen. Sehari sebelum perlakuan, medium diganti dengan medium DEMEM. Setelah itu diinkubasi dengan senyawa uji selama 24 jam. Medium diambil dan dilakukan *doublestaining*. Sel pada *coverslips* ditambahkan 10 μl 1X *Working Solution* etidium bromida/akridin oranye didiamkan selama 5 menit. *Cover slip*

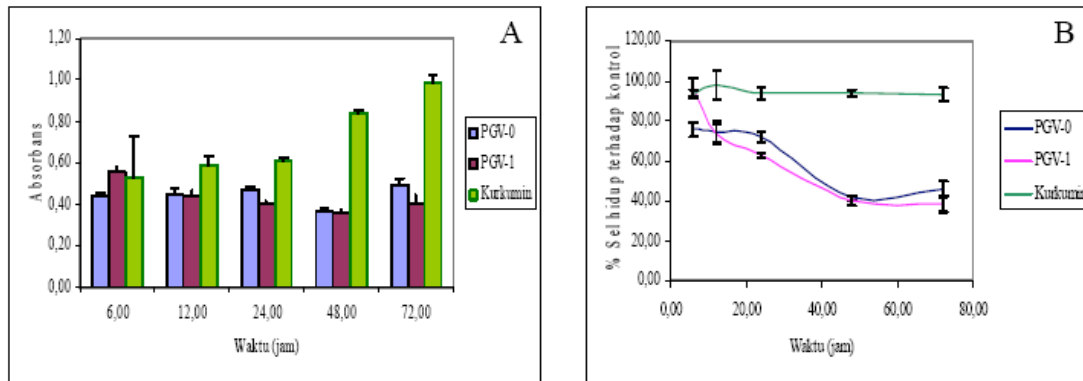
yang memuat sel diangkat, diletakan diatas objek glass. Segera diamati dibawah mikroskop flouresens (Zeiss MC 80). Sel hidup berfluoresensi hijau (dengan akridin oranye) dan sel mati berfluoresensi oranye (dengan etidium bromida). Pengecatan dilakukan pula dengan menggunakan pengecatan menggunakan DAPI (Sigma).

Analisis ekspresi gen dilakukan dengan metode *Western blot*, dilakukan untuk mengamati protein Caspase-3, PARP, semua anti bodi primer diencerkan dengan perbandingan (1:1000). Kontrol jumlah protein menggunakan antibodi α -tubulin (Sigma) pengenceran (1:5000). 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 μ g/ml N-tosyl-Lphenylalanil klorometil keton, 10 μ g/ml Soybean tripsin inhibitor). 10 μ g lisat protein dipisahkan pada 10, 12, dan 15 % SDS-PAGE dan ditransfer pada membran PVDF 20 volt permembran selama satu jam. Membran kemudian diinkubasi dalam 10 ml larutan TBST yang mengandung antibodi yang diinginkan selama 1 jam pada suhu kamar. Selanjutnya dicuci dengan PBST dan diinkubasi dengan antibodi sekunder anti rabit terkonjugasi horsedish peroksidase (Cell signalling). Untuk deteksi α -tubullin digunakan anti-mouse sekunder antibodi terkonjugasi horsedish peroksidase (Amersham). Subtrat digunakan ECL (*Enhance Chemiluminescence*) dan ECL plus (Amersham) dan pengamatan menggunakan film.

Hasil dan Pembahasan

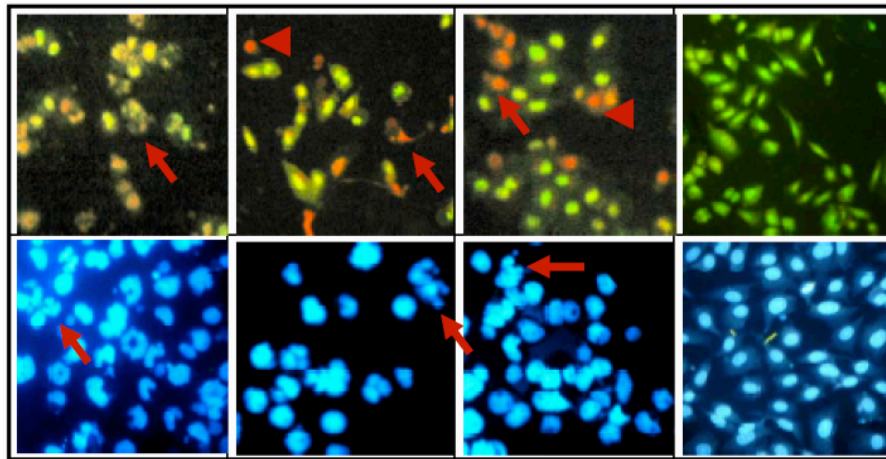
Analisis penghambatan proliferasi sel dapat dilakukan dengan pengamatan terhadap profil kinetika pertumbuhan sel T47D. Nilai absorbansi formazan, sebanding dengan tingkat kehidupan sel dalam media kultur dapat menunjukkan tingkat

pertumbuhan sel pada pengamatan berbagai waktu uji. Konversi nilai absorbansi menjadi prosentase sel hidup terhadap kontrol menggambarkan tingkat pertumbuhan sel pada berbagai waktu pengamatan dibandingkan dengan sel kontrol. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa 5,0 μM PGV-0 dan 2,5 μM PGV-1 mampu menghambat pertumbuhan sel T47D. Sedangkan kurkumin konsentrasi 10,0 μM belum mampu menghambat pertumbuhan sel T47D (Gambar 2).



Gambar 2. Pengaruh induksi PGV-0 (5,0 μM), PGV-1 (2,5 μM) dan kurkumin (10 μM) terhadap nilai absorbansi formazan (A) dan prosentase sel hidup (B). PGV-1 (2,5 μM) kemampuan menghambat pertumbuhan sel T47D lebih kuat dibanding PGV-0 (5 μM) maupun kurkumin (10 μM)

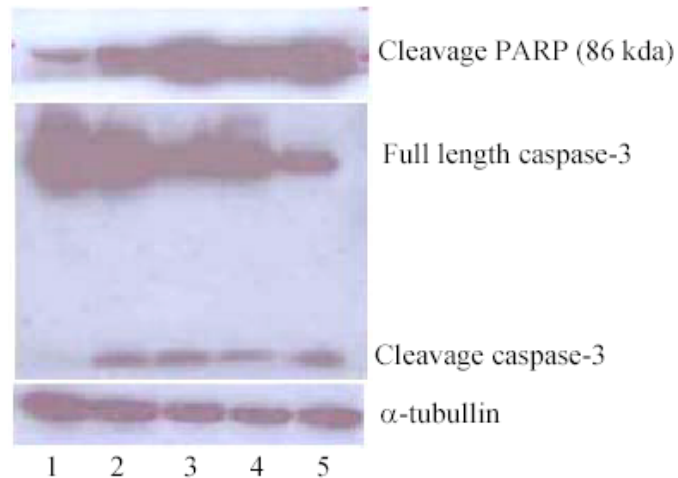
Kemampuan penghambatan pertumbuhan terhadap sel T47D oleh PGV-0, PGV-1 dan kurkumin dimungkinkan melalui jalur penghambatan daur sel ataupun pemacuan apoptosis. Pengamatan terhadap morfologi DNA dengan pengecatan etidium bromida dan akridin oranye serta pengecatan menggunakan DAPI dapat dilakukan untuk menunjukkan morfologi sel yang mati melalui proses apoptosis atau melalui proses sel lainnya. Pengamatan morfologi DNA secara konsisten menunjukkan PGV-1 memiliki potensi menginduksi apoptosis lebih kuat dibanding kurkumin maupun PGV-0 (Gambar 3)



A. PGV-1 5 μM B. Kurkumin 20 μM C. PGV-0 10 μM D. Kontrol

Gambar 3. Pengaruh induksi senyawa uji terhadap morfologi inti sel setelah inkubasi 24 jam dengan menggunakan pengecatan ganda (etidium bromida dan akridin oranye) atas dan menggunakan pengecatan DAPI, konsentrasi perlakuan sesuai dengan yang terlihat pada gambar.

Analisis Western blott terhadap *cleavage* PARP membuktikan senyawa uji (PGV-0, PGV-1 dan kurkumin) mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker T47D. Hal ini sesuai dengan yang ditunjukkan oleh induksi apoptosis sel T47D oleh etoposide sebagai kontrol positif (Gambar 4). Apoptosis ditandai dengan aktivasi caspase-3 (ditandai dengan adanya *cleavage* caspase-3 pada berat molekul 17 kda). Salah satu substrat caspase-3 adalah PARP. Analisis terhadap *cleavage* PARP menunjukkan PGV-1 mampu menginduksi *cleavage* PARP (86 kda) paling kuat dibanding kurkumin maupun PGV-0. Hasil tersebut relatif konsisten dengan pengamatan morfologi DNA pada pengecatan DNA yang menunjukkan PGV-1 dan etoposide mampu memacu apoptosis lebih kuat dibanding PGV-0 maupun kurkumin. Hasil ini konsisten pula dengan hasil analisis profil kinetika pertumbuhan sel T47D, dimana induksi PGV-1 2,5 μM memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan sel lebih kuat dibanding PGV-0 dan PGV-1.



Gambar 4. Analisis Western blott deteksi apoptosis (cleaved PARP) dan pengamatan aktivasi caspase effektor caspase-3. Protein yang dianalisis diseimbangkan dengan pengamatan terhadap α -tubullin sebagai protein kontrol. Sel tanpa perlakuan (kolom 1), perakuan PGV-0 5,0 μ M (kolom 2), PGV-1 2,5 μ M (kolom 3), kurkumin 10 μ M (kolom 4) dan dibandingkan dengan kontrol positif etoposide 2,5 μ M (kolom 5), sel dengan perlakuan mampu mengaktivasi caspase-3. PGV-1 mampu memacu terjaidnya cleaved PARP lebih kuat dibanding PGV-0 maupun kurkumin dan setara dengan etoposide. Hasil merupakan representasi pengamatan 2X independen.

Apoptosis melibatkan mekanisme yang kompleks baik melalui jalur mitokondria, melalui reseptor kematian ataupun melalui jalur survival. Ketiga jalur tersebut melibatkan aktivasi regulator caspase baik Caspase-8 ataupun Casapse-9 (18). Hal ini merupakan fenomena yang menarik, karena fenomena apoptosis melalui aktivasi caspase-9 biasanya melibatkan p53, sementara sel T47D telah kehilangan fungsi p53-nya. Hilangnya fungsi p53 dalam sel karena telah mengalami mutasi pada residu 194, sehingga leusin berubah menjadi fenilalanin pada protein p53 yang menyebabkan p53 tidak berfungsi. Hal ini berakibat p53 dalam sel T47D kehilangan fungsi pada penghambatan siklus sel pada fase G1 dan G2 maupun memacu terjadinya apoptosis. (19,20,21,22,23). Mutasi tersebut mengakibatkan protein p53 tidak dapat meregulasi protein proapoptosis yang diatur oleh p53 seperti BAX dan PUMA (24).

Terjadinya apoptosis umumnya dikaitkan dengan pelepasan sitokrom c yang memacu terbentuknya kompleks Apaf1 dan procaspase-9 untuk memacu terjadinya apoptosis melalui aktivasi caspase-9 yang ditandai dengan adanya cleavage caspase-9 (18,25). Aktivasi caspase-9 dimungkinkan pula terjadi tanpa adanya proses proteolitik terhadap caspase-9 (26). Aktivasi tersebut diikuti dengan aktivasi caspase-3 yang berikutnya akan memacu terjadinya proteolisis substrat caspase-3 diantaranya PARP (17,27). Hal tersebut menimbulkan dugaan bahwa pemacuan apoptosis oleh analog kurkumin PGV-0 pada sel T47D melalui pelepasan sitokrom c dari mitokondria.

Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa induksi apoptosis oleh senyawa-senyawa antimikrotubul menyebabkan terjadinya hiperfosforilasi Bcl-2. Hal ini menyebabkan Bcl-2 antiapoptotik tidak mampu membentuk dimer dengan BAX dan memacu dilepaskannya sitokrom c dari mitokondria dan memacu terjadinya apoptosis melalui aktivasi caspase tanpa melibatkan p53 (28,29,30). Hasil pengamatan menunjukkan adanya aktivasi caspase-3 dan diikuti dengan adanya cleavage PARP (Gambar 4). Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian (31) yang menunjukkan adanya fosforilasi Bcl-2 mulai pada jam ke-3, pada sel MCF-7 yang diinduksi dengan senyawa antimikrotubul vinorelbine dan estramusin. Fosforilasi tersebut mendahului terjadinya peristiwa apoptosis pada sel tersebut (31). Penelitian yang serupa dengan menggunakan vincristin dan paclitaxel menunjukkan adanya hiperfosforilasi Bcl-2 mulai jam ke-6 dan diikuti dengan aktivasi caspase-3 dan cleavage PARP pada jam ke-12 sebelum terjadinya fragmentasi DNA (30). Mekanisme fosforilasi bcl-2 belum sepenuhnya ditemukan. Secara umum fosforilasi bcl-2 tersebut melibatkan protein kinase. Pengamatan terhadap protein-protein yang terlibat pada proses apoptosis pada berbagai waktu dapat dilakukan

untuk memastikan mekanisme apoptosis oleh kurkumin dan analognya. Demikian pula pengamatan terhadap gen-gen yang terlibat pada regulasi daur sel.

Kesimpulan

Analog kurkumin PGV-0 dan PGV-1 mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D melalui jalur pemacuan apoptosis. Analog kurkumin mampu memacu terjadinya aktivasi caspase-3 yang mengakibatkan terjadinya cleavage PARP sebagai penanda terjadinya apoptosis pada sel kanker payudara T47D.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kami tujukan kepada: Mrs. Sachiko Iida (dukungan finansial), Prof. Tatsuo Takeya, Prof. Naotake Ogasawara, sehingga penelitian dapat dikerjakan di laboratorium Bioscience Nara Institute of Science and Technology. Terima kasih pula kepada proyek penelitian Hibah Bersaing Dirjen Dikti Direktorat Penelitian dan Pengabdian Masyarakat DEPDIKNAS RI yang telah mendanai penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Tjindarbumi, D. and Mangunkusumo, R., 2002, Cancer in Indonesia, Present and Future, *Jpn J Clin Oncol.*, 32(Supplement 1), S17-S21
2. 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
3. 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
4. Aggarwal, B.B., Kumar, A, and Bharti, A.C., 2003, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.*, 23(1A), 363-398.
5. Meiyanto, E., 1999, Kurkumin Sebagai Obat Anti Kanker: Menelusuri Mekanisme Aksinya, *Majalah Farmasi Indonesia*, 10(4), 224-236.

6. 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.
7. 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
8. Squires, M.S., Hudson, E.A., Howells, L., Houghton, C.E., Jones, J.L., Fox, L.H., Dickens, M., Prigent, S.A., and Manson M.M., 2003, Relevance of mitogen activate protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/PKB) pathways to induction of apoptosis by curcumin in breast cancer, *Biochem. Pharmacol.*, **65**(3), 361-376.
9. Choudhuri, T., Pala, S., Munna L. Aggarwal, B.B., Dasa, T., and Saa, G., 2002, Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction, *FEBS Letters*, **512**, 334-340.
10. Meiyanto, E., 2004, Efek Antiproliferatif dan Antimetastatik tulang Pentagamavunon-0 Terhadap Kanker Payudara, Laporan RUT X, Kementerian Ristek RI
11. Tonnesen H.H., and Karlsen, J., 1985, Studies on curcumin and curcuminoids, VI: Kinetics of Curcumin Degradation in Aqueous Solution, Original Paper, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 402-404.
12. 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.
13. Reksohadiprodjo M.S. *et al.*, 2004, *United States Patent, No: US 6,777,447 B2*, date: Aug 17 2004.
14. Melannisa, R., 2004, Pengaruh PGV-1 Pada Sel Kanker Payudara T47D yang diinduksi 17 β -Estradiol: Kajian Antiproliferasi, Pemacuan Apoptosis, dan Antiangiogenesis, Tesis, Progam Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Jogjakarta
15. Kaufmann, S.H., Desnoyers, Y., Ottaviano, N., Davidson, E., and Poirier, 1993, Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res*, **53**, 3976-3985
16. Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallani, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Munday, N.A, Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, Y., Yu, V.L., Miller, D.K., 1995, Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature*, **376**, 37-43
17. Cryns, V., and Yuan, J., 1998, Protease to die, *Genes Dev*, **12**, 1551-1570
18. Herr, I., and Debatin, K.M., 2001, Cellular Stress Response and Apoptosis in Cancer Therapy, *Blood*, **98**, 2603-2619
19. O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Fien, S., Fornace, A.J., and Kihl, K.W., 1997, Characterization of The p53 Tumor Suppressor Pathway in Cell Lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen Correlation With

- The Growth Inhibitory Potency of 123 Anticancer Agents, *Cancer Res*, 57, 4285-4300
20. Dinda, S., Kodali-Gali, S., Sevilla, L., Burkley, M., Hurd, C., Moudgil, V.K., 1997, Inhibition of proliferation of T47D human breast cancer cells: Alterations in progesterone receptor and p53 tumor suppressor protein, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 175, 81-89
 21. Wosikowski, J., Regis, J.T., Robey, R.W, Alvarez, M., Buters, J.T.M, Gudas, J.M., Bates, S.E., 1995, Normal p53 Status and Function Despite the Development of Drug Resistance in Human Breast Cancer Cells, *Cell Growth & Differentiation*, 6, 1395-1403
 22. Lacroix, M., , Toillon, R.A., and Leclercq, G., 2006, p53 and breast cancer, an update, *Endocrine-Related Cancer*, 13 293–325
 23. Lu, X., Errington, J., Curtin, N.J., Lunec, J., Newell, D.R., 2001, The Impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs, 2001, *Clinical Cancer Research*, 7, 2114-2123
 24. Loo, G.V., Saelens, X., van Gurp, M., MacFartana, M., Martin, S.J., Vandenabeele, P., 2002, The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet, *Cell Death and Differentiation*, 9, 1031-1042
 25. Kasibhatla, S., and Tseng, B., 2003, Why Target Apoptosis in Cancer Treatment?, *Mol. Canc. Ther.*, 2, 573-580
 26. Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M., and Salvesen, G.S., 1999, Caspase-9 can be activated without proteolytic processing, *J Biol Chem*, 274, 8359–8362
 27. Chang, H.Y., And Yang, X., 2000, Proteases for Cell Suicide: Functions and Regulation of Caspases, *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 64, 821-846
 28. Blagoskloony, M.V., Gianakakou, P., El-Diery, W.S., Kingston, D.G., Higgs, P.I., Nackers, I., 1997, Raf-1/Bcl-2 Phosphorylation: a Step From Microtubule Damage to Cell Death, *Cancer Res*, 57, 130-135
 29. Halder, S., Chntapalli, J., Crocc, C.M., 1996, Taxol Induces Bcl-2 Phosphorylation and Death of Prostate Cancer Cells, *Cancer Res*, 56, 1253
 30. Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Korsmeyer, S.,I., Nestrova, M., Cho-Chung, Y.S., Longo, D.I., 1998, Involvement of Microtubules in The Regulation of Bcl-2 Phosphorylation and Apoptosis Through c-AMP-dependent Protein Kinase, *Mol. Cell Biol.*, 18, 3509-3517
 31. Wang, T.H., Popp, D.M., Wang, H.S., Saitoh, M., Mural, I.G., Henley, D.C., 1999, Microtubule Dysfunction Induced by Paclitaxel Initiates Apoptosis Through both c-jun N Terminal Kinase (JNK)-dependent and Independent Pathways in Ovarian Cancer Cells, *J. Biol. Chem.*, 274, 8208-8216

