

Pengaruh Perlakuan PGV-1, PGV-0 dan Kurkumin terhadap Protein yang Terlibat dalam Siklus Sel Fase G₂-M dan Apoptosis pada Sel Kanker Payudara T47D

(The Effect of PGV-1, PGV-0 and Curcumin on Protein Involve in G₂-M Phase of Cell Cycle and Apoptosis on T47D Breast Cancer Cell Line)

MUHAMMAD DA'I^{1*}, UMAR ANGGARA JENIE², SUPARDJAN AM²,
EDY MEIYANTO², MASASHI KAWAICHI³

¹Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah Surakarta, Indonesia.

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

³Graduate School of Biological Science, Nara Institute Science and Technology, Japan.

Diterima 2 Maret 2012, Disetujui 7 Juni 2012

Abstrak: Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa analog kurkumin PGV-1 dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara pada fase G₂-M dan menginduksi terjadinya apoptosis. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan pengaruh molekuler analog kurkumin PGV-0 dan kurkumin dengan PGV-1 pada siklus sel dan apoptosis. Metode *flowcytometry* dilakukan dengan menganalisis pengaruh perlakuan PGV-1 (2,5 µM), PGV-0 (5,0 µM) dan kurkumin (10,0 µM) terhadap distribusi sel pada berbagai fase siklus sel T47D. Metode *Western blot* dilakukan untuk mengamati pengaruh perlakuan senyawa uji terhadap protein yang terlibat pada siklus sel (p21 dan Cdc-2) dan apoptosis (Caspase-3/7/9). Hasil pengamatan pada perlakuan dengan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin menunjukkan fenomena hiperploidi. Perlakuan dengan PGV-1 secara spesifik menunjukkan fenomena penghambatan pada fase G₂-M. Pengamatan molekuler menunjukkan PGV-1 dan PGV-0 mampu mempengaruhi ekspresi protein p21 dan Cdc-2 sedangkan kurkumin hanya mempengaruhi aktivasi Cdc-2. Ketiga senyawa uji terbukti mampu menginduksi apoptosis pada sel T47D melalui aktivasi Caspase-3/7. Secara keseluruhan, perlakuan ketiga senyawa uji mampu mempengaruhi siklus sel dan dapat menginduksi terjadinya apoptosis pada sel T47D.

Kata kunci: kurkumin, PGV-0, PGV-1, siklus sel, apoptosis, sel T47D.

Abstract: Previous experiments showed that curcumin analogue (PGV-1) inhibited breast cancer cell (T47D) growth at G₂-M phase and induced cell apoptosis. This experiment was conducted to investigate the molecular effect of another curcumin analogue, PGV-0 and curcumin on the cell cycle progression and apoptosis as compared to the PGV-1. Flowcytometric method was conducted to analyze the effect of PGV-1 (2,5 µM), PGV-0 (5,0 µM) and curcumin (10,0 µM) on the cell distribution of various phase of T47D cell cycle. Western blot was also conducted to observe the effect of those compounds on proteins that involved in cell cycle (i.e. p21 and Cdc-2) and apoptosis (Caspase-3/7/9). The results showed that PGV-1, PGV-0 and curcumin induced hyperploidy phenomenon on T47D cell. PGV-1 inhibited the cell cycle specifically on G₂-M phase. Molecular observation showed that PGV-1 and PGV-0 were able to increase the expression of p21 protein and the Cdc-2 proteins, whilst curcumin was able to activate the Cdc-2 protein. The compounds have ability to induce apoptosis on T47D cell via Caspase3/7 activation. In conclusion, PGV-1, PGV-0 and curcumin inhibited the T47D cell cycle progression and induced cell apoptosis.

Keywords: curcumin, PGV-0, PGV-1, cell cycle, apoptosis, T47D cell.

* Penulis korespondensi, Hp. 0822616732
e-mail: abulathfi@gmail.com

PENDAHULUAN

KURKUMIN (1,7-bis(41-hidroksi-31-metoksifenil)-1,6-heptadiena-3,5-dion) merupakan salah satu komponen aktif tanaman *Curcuma* sp. yang telah dibuktikan memiliki aktivitas antikanker⁽¹⁾. Analog kurkumin dengan struktur monoketon telah dikembangkan dan banyak diteliti aktivitasnya, antara lain adalah pentagamavunon-0 (2,5-bis(41-hidroksi-31-metoksi)-benzilidin-siklo-pentanon dikenal sebagai PGV-0 dan pentagamavunon-1 (2,5-bis(41-hidroksi,31,51-dimetil)-benzilidin-siklopentanon dikenal sebagai PGV-1⁽²⁾).

Penelitian terdahulu telah menunjukkan potensi aktivitas PGV-0 dan PGV-1 sebagai antiinflamasi dan antioksidan⁽³⁾. PGV-0 telah dibuktikan mampu menghambat pertumbuhan sel HeLa, Myeloma dan sel Raji lebih baik dibanding kurkumin⁽⁴⁾. Aktivitas terhadap sel kanker payudara T47D menunjukkan bahwa PGV-1, PGV-0 dan kurkumin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 1,74; 9,39 dan 24,97 μ M⁽⁵⁾.

Penelitian lanjutan menunjukkan bahwa PGV-1 secara konsisten mampu menghambat pertumbuhan sel T47D lebih baik dibanding kurkumin dan PGV-0 dan ketiga senyawa mampu mengaktivasi caspase-3 untuk menginduksi terjadinya apoptosis sel T47D⁽⁶⁾. Pengamatan lanjutan terhadap PGV-1 (2,5 μ M), menunjukkan kemampuan menghambat siklus sel pada fase G₂-M dan hiperploidi melalui aktivasi Cdc-2 dan peningkatan ekspresi p21⁽⁷⁾. PGV-1 telah dibuktikan pula mampu menurunkan faktor angiogenik (VEGF dan COX-2) pada sel T47D terinduksi estrogen⁽⁸⁾. Hasil-hasil penelitian tersebut membuktikan kemampuan PGV-1 (2,5 μ M) untuk mempengaruhi regulasi molekuler sel kanker T47D.

Penelitian terhadap PGV-0 menunjukkan potensi antiproliferasi terhadap sel Myeloma⁽⁹⁾. Pengamatan penghambatan terhadap siklus sel melalui pengamatan terhadap analisis inkorporasi BrdU yang menjadi penanda sintesis DNA pada regulasi siklus sel menunjukkan kemampuan PGV-0 untuk menghambat siklus sel⁽¹⁰⁾. Pengamatan menunjukkan pula kemampuan PGV-0 untuk menginduksi terjadinya apoptosis pada sel kanker payudara T47D⁽⁶⁾. Penelitian-penelitian tersebut belum secara mendalam menganalisis efek induksi PGV-0 terhadap siklus sel dan induksi apoptosis pada sel T47D.

Aktivitas antikanker kurkumin telah diteliti sebelumnya dan menunjukkan kemampuan kurkumin dalam menghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan siklus sel dan

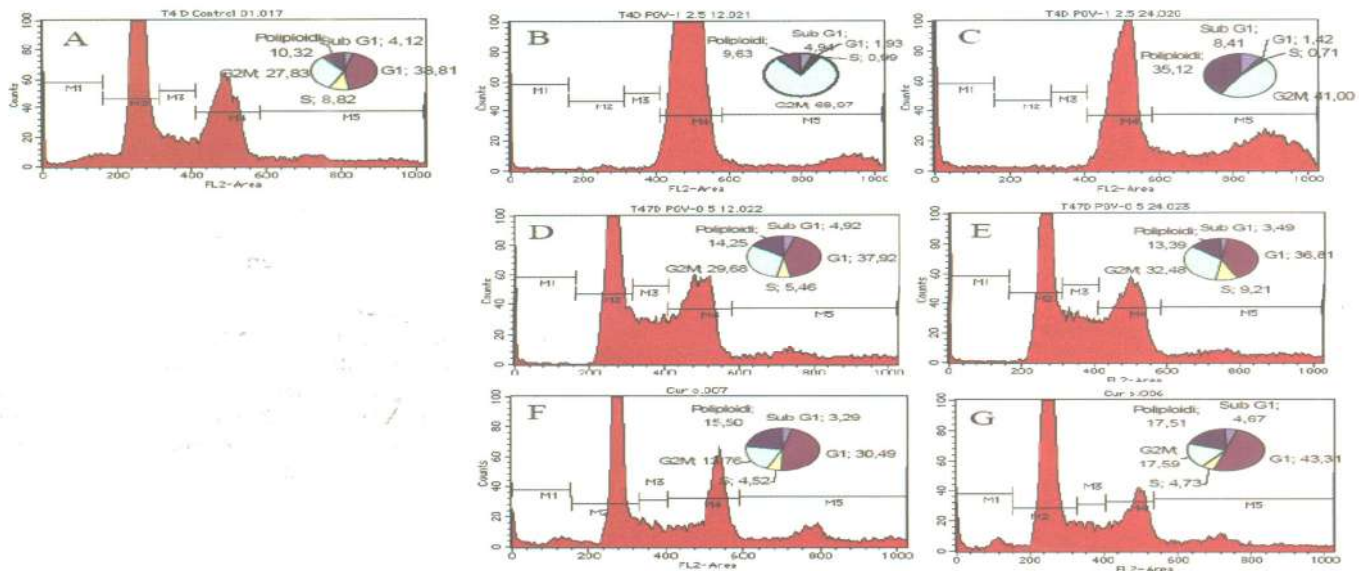
dapat memacu terjadinya apoptosis⁽¹¹⁾. Kurkumin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker payudara T47D dan MCF7 dikaitkan dengan sifat antiestrogeniknya⁽¹²⁾. Kurkumin telah dibuktikan pula menghambat siklus sel kanker payudara T47D untuk memasuki fase sintesis DNA pada pengukuran inkorporasi BrdU dengan DNA⁽¹³⁾. Kurkumin mampu memacu terjadinya apoptosis sel kanker payudara pada fase G₂-M^(14,15).

Penelitian lain membuktikan bahwa kurkumin mampu menurunkan level ekspresi Cyclin D1 sehingga menghambat proses siklus sel⁽¹⁶⁾. Kurkumin telah dibuktikan mampu menghambat siklus sel melalui perusakan struktur spindle mitosis dan memacu terjadi kematian sel pada tahap mitosis⁽¹⁷⁾. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan potensi kurkumin untuk mempengaruhi pertumbuhan sel kanker pada level molekuler. Penelitian ini dilakukan untuk membandingkan pengaruh perlakuan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin terhadap siklus sel dan apoptosis pada sel kanker payudara T47D dengan pengamatan pada level molekuler terhadap beberapa protein penanda.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Sel T47D merupakan sel kanker payudara manusia merupakan koleksi *Cancer Chemoprevention Research Center* (CCRC), Fakultas Farmasi UGM yang diperoleh dari Prof. Tatsuo Takeya dan Prof. Masashi Kawaichi (Laboratorium 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). Pengecatan DNA menggunakan etidium bromida dan akridin oranye, DAPI dan RNA-se. Pelarut senyawa uji adalah DMSO (Sigma). Bahan lain yang digunakan adalah natrium karbonat (E.Merck), fungison, 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*), Caspase-3/7/9 (*Cell Signalling*), PARP (*Cell Signalling*), α -tubulin (Sigma).

METODE. Analisis *flowcytometry*. Setelah sel diinduksi dengan perlakuan PGV-1, kurkumin dan PGV-0 dengan konsentrasi tertentu, sel dicuci dengan PBS dan ditambahkan dengan larutan propidium iodida 500 μ L (PI: 50 μ g/mL dalam PBS mengandung 0,1% Triton-X). Sel selanjutnya diberi perlakuan RNA-se bebas-DNase (20 μ g/mL) selama 10 menit pada suhu 37°C. Sel dianalisis dengan FACS Calibur dimasukkan pada alat *flowcytometer*.



Gambar 1. Analisis *flowcytometric* sel T47D dengan perlakuan PGV-1 2,5 μM jam ke-12⁽⁷⁾ (B) dan jam ke-24⁽⁷⁾ (C). Perlakuan PGV-0 5,0 μM jam ke-12 (D) dan jam ke-24 (E), serta perlakuan kurkumin 10,0 μM jam ke-12 (F) dan jam ke-24 (G). Analisis dibandingkan dengan sel kontrol tanpa perlakuan (A). Hasil merupakan representasi uji 3x independen.

μM). Perlakuan PGV-0 (5,0 μM), pada jam ke-12 dan ke-24 menyebabkan akumulasi sel pada G₂-M lebih tinggi dibanding kontrol. Hiperploidi lebih tinggi dibanding kontrol, akan tetapi pada jam ke-24 jumlah hiperploidi lebih rendah dibanding perlakuan jam ke-12. Hasil menunjukkan pula bahwa sel dengan perlakuan PGV-0 relatif masih dapat menjalankan siklus sel secara normal, terlihat sel masih dapat memasuki fase G₁ normal. Perlakuan kurkumin (10,0 μM) pada sel T47D terlihat mampu meningkatkan jumlah sel yang terakumulasi pada fase G₁ mulai jam ke-24 yang berbeda signifikan dengan sel kontrol ($p = 0,05$). Pada jam ke-12 belum terjadi akumulasi sel pada fase G₁ tersebut.

Perlakuan dengan kurkumin meningkatkan jumlah sel hiperploidi pada jam ke-12 dan 24. Akumulasi sel pada hiperploidi menunjukkan gagalnya proses mitosis secara sempurna, pembelahan inti sel tidak diikuti dengan pembelahan sel sehingga sel terbaca sebagai hiperploidi pada detektor⁽¹⁸⁾.

Fenomena paling menarik dari data tersebut adalah kemampuan PGV-1 dalam menghambat pertumbuhan sel pada fase G₂-M dan kemampuan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin untuk menstimulasi akumulasi sel hiperploidi dan peningkatan sel pada fase sub G₁ pada beberapa perlakuan yang

mengindikasikan terjadinya peristiwa apoptosis. Untuk memastikan mekanisme penghambatan pertumbuhan sel T47D maka dilakukan analisis *Western blot* terhadap protein-protein yang terlibat pada fase G₂-M dan apoptosis.

Pengaruh perlakuan PGV-1 terhadap siklus sel, khususnya pada fase G₂-M dan hiperploidi terlihat mulai muncul pada konsentrasi 2,5 μM . Perlakuan PGV-1 pada konsentrasi 1,0 μM belum menunjukkan perubahan yang signifikan dibanding sel kontrol. Perlakuan PGV-1 1,0 μM terlihat mampu memacu akumulasi sel pada area sub G₁. Hal ini membuktikan bahwa efek penghambatan terhadap proliferasi sel T47D tergantung pada konsentrasi PGV-1. Secara umum perlakuan sel T47D dengan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin tidak menunjukkan perubahan yang besar terhadap jumlah populasi sel pada fase sub G₁. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh: a) apoptosis pada sel kanker payudara tidak diikuti mekanisme fragmentasi DNA⁽¹⁹⁾, hal ini menyebabkan sedikitnya jumlah sel apoptosis yang terdeteksi pada fase sub G₁; b) mutasi p53 pada sel T47D kemungkinan menyebabkan kegagalan sel menjaga terjadinya *mitotic arrest* dan melanjutkan siklus sel sehingga mengalami kelainan mitosis dan menyebabkan akumulasi hiperploidi untuk

selanjutnya mengalami apoptosis dengan durasi waktu yang lebih lama, sehingga pada jam ke-12 dan 24 belum terlihat terjadinya akumulasi sel yang besar pada fase sub G_1 ^(20,21). Kelainan mitosis yang menyebabkan terjadinya akumulasi sel hiperploid mengakibatkan mekanisme kematian yang lain yakni *mitotic catastrophe*⁽²²⁾.

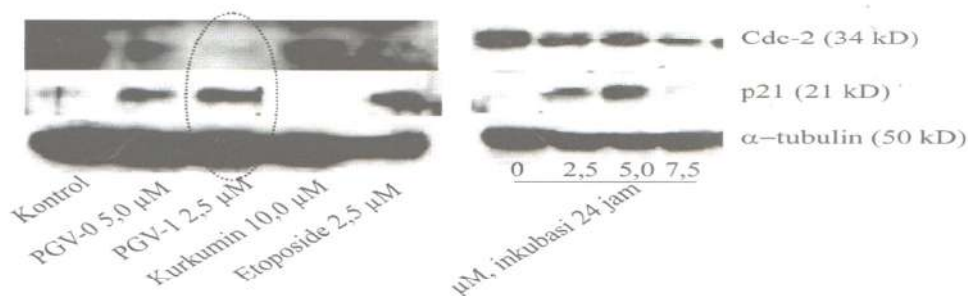
Analisis pengaruh perlakuan PGV-1, kurkumin dan PGV-0 terhadap protein yang terlibat pada fase G_2 -M. Siklus sel pada fase G_2 -M diatur oleh kompleks Cyclin B/Cdc-2 yang ditentukan oleh status fosforilasi Cdc-2. Sebelum sel memasuki fase G_2 -M, Cdc-2 berada dalam keadaan terfosforilasi pada treonin 14 oleh kinase sitoplasma Myt1^(23,24) dan fosforilasi pada tirosin 15 oleh kinase inti sel Wee1⁽²⁵⁾. Aktivasi Cdc-2 melibatkan proses defosforilasi oleh Cdc25 pada kedua asam amino⁽²⁶⁾ tersebut dan diikuti dengan fosforilasi pada treonin161 oleh CAK⁽²⁷⁾. Investigasi dilakukan terhadap status fosforilasi Cdc-2 pada tirosin 15, yang menunjukkan kompleks antara Cdc-2 dan CyclinB berada dalam keadaan aktif. Kompleks aktif Cyclin-B dan Cdc-2 dapat dihambat oleh Cip-Kip protein antara lain p21, p27 dan p57. Protein-protein tersebut bekerja dengan cara menghambat aktivitas kompleks Cyclin dan CDK^(28,29). Pada penelitian ini investigasi diarahkan pada protein p21 yang memiliki peran lebih dominan pada penghambatan siklus sel dibanding p27 dan p57⁽³⁰⁾.

Perlakuan PGV-1 (2,5 μ M) dan PGV-0 terhadap sel kanker payudara T47D dapat meningkatkan ekspresi protein p21 dan memacu terjadinya aktivasi Cdc-2, sedangkan perlakuan dengan kurkumin menunjukkan tidak adanya kenaikan ekspresi p21 dan sel mengalami defosforilasi Cdc-2 dengan tingkat yang lebih rendah dibanding PGV-1 dan PGV-0 (Gambar 2A). Pengamatan ekspresi protein

setelah perlakuan PGV-1 (2,5, 5,0 dan 7,5 μ M) menunjukkan fenomena yang konsisten, ditandai dengan adanya defosforilasi Cdc-2 dan peningkatan ekspresi p21. Setelah perlakuan PGV-1 (7,5 μ M), peningkatan ekspresi p21 tidak sekuat dibanding perlakuan konsentrasi 2,5 dan 5,0 μ M (Gambar 2B). Defosforilasi Cdc-2 merupakan mekanisme aktivasi kinase tersebut, menyebabkan terjadinya mitosis prematur dan kegagalan sitokinesis. Sitokinesis dapat berlangsung apabila Cdc-2 mengalami inaktivasi⁽³¹⁾. Hal ini menyebabkan terjadinya akumulasi sel hiperploid pada pengamatan *flowcytometric* sel dengan perlakuan PGV-1 (2,5 μ M).

Penelitian ini dilakukan pula terhadap etoposida sebagai pembanding penginduksi apoptosis. Perlakuan dengan etoposida 2,5 μ M menyebabkan peningkatan ekspresi p21 pada kondisi defosforilasi Cdc-2 relatif lebih lemah dibanding dengan perlakuan PGV-1. Pada kondisi tersebut, etoposida mampu memblokir siklus sel pada fase G_2 -M dan meningkatkan akumulasi populasi hiperploid, tetapi kemampuan modulainya lebih rendah dibanding perlakuan dengan PGV-1 2,5 μ M. Di sisi lain, etoposida terlihat memiliki kemampuan menginduksi terjadinya proses apoptosis lebih kuat dibanding perlakuan dengan PGV-1. Hal ini terlihat pada pengamatan pematangan PARP sebagai penanda apoptosis dengan perlakuan etoposida meningkat sangat signifikan dibanding sel kontrol maupun perlakuan dengan PGV-1, sehingga dimungkinkan PGV-1 memiliki mekanisme yang berbeda dengan etoposida pada penghambatan pertumbuhan sel kanker payudara.

Analisis Western blot terhadap protein-protein regulator apoptosis pada sel T47D setelah perlakuan kurkumin dan PGV. Pengamatan dengan analisis *flowcytometric* menunjukkan



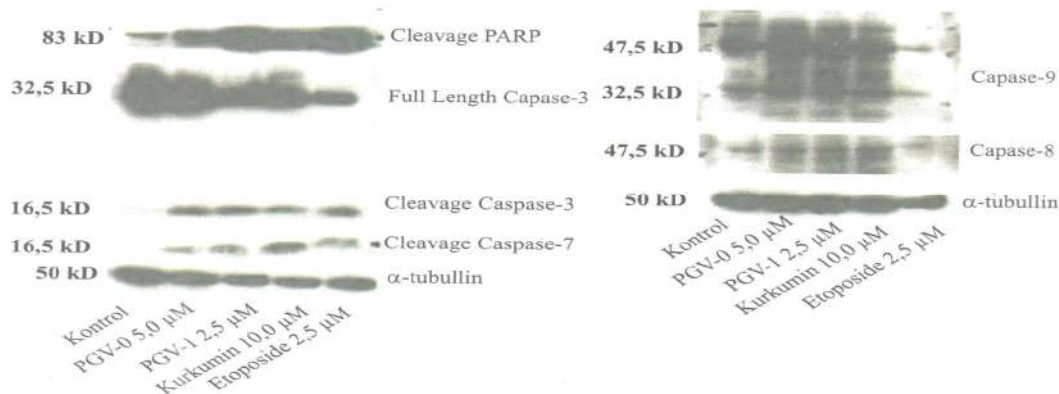
Gambar 2. (A) Analisis Western blot protein Cdc-2 terfosforilasi Tirosin-15 dan p21 setelah perlakuan PGV-0, PGV-1 dan kurkumin. (B) Pengaruh variasi konsentrasi perlakuan PGV-1 pada sel T47D, PGV-1 mampu meningkatkan ekspresi p21 pada kondisi Cdc2 terdefosforilasi.

adanya peningkatan jumlah sel pada area sub G_1 (menggambarkan adanya proses apoptosis) pada perlakuan sel dengan dengan kurkumin, PGV-0 dan PGV-1. Peningkatan tersebut terjadi setelah perlakuan selama 24 jam, kecuali pada perlakuan dengan PGV-0. Peningkatan terbesar terjadi pada perlakuan sel dengan PGV-1 konsentrasi 1 dan 2,5 μM setelah inkubasi 24 jam. Pengamatan apoptosis pada area $M1$ (sub G_1) pada analisis *flowcytometric* terhadap sel T47D menunjukkan perubahan yang sangat kecil. Hal ini kemungkinan disebabkan pada sel T47D proses apoptosis tidak ditandai dengan terjadinya fragmentasi DNA⁽¹⁹⁾ dan kemungkinan apoptosis belum terjadi secara maksimal. Untuk memastikan adanya apoptosis pengamatan dilakukan dengan analisis *Western blot* terhadap protein-protein yang terlibat pada proses apoptosis seperti PARP, Caspase-3/6/7/8 dan -9.

Proses apoptosis pada sel T47D dapat dianalisis dengan mengamati terjadinya pemotongan PARP (pol (ADP-ribosa) polimerase), suatu protein penanda terjadinya proses apoptosis ditunjukkan dengan terjadinya pemotongan dari berat molekul 116 kDa menjadi 89 kDa dan 24 kDa. Caspase 3 yang diaktifkan selama proses apoptosis merupakan caspase yang bertanggung jawab terhadap terjadinya pemotongan PARP tersebut⁽³²⁾. Penelitian kami sebelumnya menunjukkan kemampuan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin mampu memicu aktivasi Caspase-3⁽⁶⁾. Pada penelitian ini pengamatan kami lakukan pula terhadap Caspase-7/8 dan Caspase-9.

Analisis *Western blot* terhadap pemotongan 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 etoposida sebagai kontrol positif (Gambar 3). Pentagamavunon-1 (PGV-1) mampu menginduksi pemotongan PARP paling kuat dibanding kurkumin maupun PGV-0. Hasil ini konsisten pula dengan hasil analisis *flowcytometric*, dimana perlakuan PGV-1 2,5 μM 24 jam menghasilkan area sub G_1 lebih besar dibanding kurkumin dan PGV-0.

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 Caspase-9⁽³³⁾. Hasil pengamatan menunjukkan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin tidak mampu mengaktifkan Caspase-8 sementara pengamatan terhadap Caspase-9 menunjukkan adanya kemungkinan aktivasi Caspase-9 pada sel T47D (Gambar 4), hasil ini perlu dilakukan konfirmasi ulang. 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 T47D disebabkan adanya mutasi pada residu 194, leusin berubah menjadi fenilalanin pada gen p53, sehingga menyebabkan p53 tidak berfungsi. P53 dalam sel T47D kehilangan fungsi pada penghambatan siklus sel pada fase G_1 dan G_2 .



Gambar 3. Analisis *Western blot* untuk deteksi apoptosis (*cleaved PARP*) dan pengamatan aktivasi Caspase efektor Caspase-3(6), Caspase-7 dan Caspase regulator (Caspase-8/9), dengan kontrol α -tubullin. PGV-0, PGV-1, kurkumin dan etoposida dapat mengaktifkan Caspase efektor, tetapi tidak mengaktifkan Caspase regulator. PGV-1 memacu terjadinya *cleaved PARP* setara dengan etoposida dan lebih kuat dibanding PGV-0 maupun kurkumin. Hasil merupakan representasi pengamatan 2x independen.

maupun memacu terjadinya apoptosis^(34,35,36,37).

Hasil pengamatan sebelumnya menunjukkan bahwa perlakuan PGV-1 tidak meningkatkan ekspresi protein p53⁽⁷⁾. Protein p53 merupakan regulator apoptosis sekaligus merupakan faktor transkripsi protein pro apoptosis seperti PUMA. Meningkatnya level ekspresi PUMA dapat meningkatkan ekspresi Bax untuk selanjutnya memacu pelepasan sitokrom C dan memacu terjadinya apoptosis melalui aktivasi Caspase-9^(38,39). PUMA dapat pula memacu terjadinya pelepasan sitokrom C secara langsung untuk selanjutnya memacu terjadinya apoptosis. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekspresi PUMA dan Bax pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1 tidak menampakkan perubahan⁽⁷⁾. Hasil-hasil tersebut membuktikan bahwa proses apoptosis pada sel T47D dengan perlakuan PGV-1 (maupun PGV-0 dan kurkumin), kemungkinan melibatkan jalur dan mekanisme yang berbeda.

Analisis pengaruh perlakuan kurkumin dan PGV terhadap modulasi siklus sel T47D.

Hasil uji secara umum menunjukkan bahwa analog kurkumin PGV memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan sel pada fase G₂-M dan menyebabkan sel T47D mengalami hiperploidi. PGV-0 terlihat memiliki kecenderungan aktivitas yang sama dengan PGV-1 dengan potensi lebih lemah dibanding PGV-1. Perlakuan kurkumin menunjukkan adanya peningkatan hiperploidi sel, tanpa diikuti akumulasi sel pada fase G₂-M. Pada jam ke-24 perlakuan kurkumin, sel terlihat mengalami sedikit peningkatan pada fase G₁.

Perlakuan dengan ketiga senyawa uji menunjukkan terdapatnya akumulasi sel hiperploidi. Berdasarkan hasil percobaan dengan analisis *flowcytometric* dan analisis *Western blot* oleh senyawa uji terhadap sel kanker payudara terlihat bahwa PGV-1 memiliki potensi terbesar untuk dikembangkan sebagai senyawa antikanker dengan potensi penghambatan spesifik pada siklus sel kanker payudara khususnya penghambatan pada fase G₂-M dan hiperploidi (Tabel 2). Senyawa-senyawa tersebut menginduksi sel untuk mengalami *cell cycle arrest* pada fase mitosis. Perlakuan dengan PGV-1 dan PGV-0 menunjukkan adanya akumulasi sel pada fase G₂-M dan diikuti dengan adanya aktivasi Cdc-2 dan peningkatan ekspresi p21. Perlakuan kurkumin tidak menunjukkan terjadinya peningkatan ekspresi p21, akan tetapi menunjukkan adanya aktivasi Cdc-2 dan akumulasi hiperploidi sel, fenomena ini belum dapat dijelaskan penyebabnya. Penelitian sebelumnya membuktikan kurkumin mampu menginduksi kerusakan spindle mitosis, sehingga sel mengalami kegagalan membelah secara sempurna⁽⁴¹⁾. Hal ini

kemungkinan menyebabkan adanya peningkatan jumlah sel hiperploidi pada analisis *flowcytometric* tanpa diikuti kenaikan ekspresi p21. Mekanisme ini menyerupai beberapa senyawa antimikrotubul seperti nokodazol, vinkristin dan takso^(22,40,41,42,44).

Secara umum sel kanker payudara memiliki ekspresi protein Cyclin D1 cukup tinggi⁽⁴³⁾. Perlakuan kurkumin pada sel kanker payudara T47D konsentrasi 10,0 μ M selama 24 jam, terbukti tidak mampu menurunkan level ekspresi protein Cyclin D1 pada beberapa sel kanker payudara antara lain sel T47D dan MDA-MD-468 dan MCF-7. Akan tetapi pada sel T47D dengan perlakuan yang sama, terbukti kurkumin mampu menurunkan level ekspresi Cyclin D3 maksimal pada jam ke-24 dan setelah jam ke-48 Cyclin D3 kembali normal⁽¹⁵⁾. Hal ini kemungkinan yang menyebabkan adanya kenaikan jumlah sel pada fase G₁ setelah perlakuan kurkumin 24 jam. Hasil analisis *Western blot* menunjukkan bahwa kurkumin tidak mampu meningkatkan level ekspresi protein p21, sehingga kurkumin tidak mampu memacu terjadinya *cell cycle arrest* pada fase G₁ maupun G₂-M secara signifikan. Hasil serupa membuktikan perlakuan kurkumin 10,0 μ M tidak menghambat sel pada fase G₁ dan G₂⁽¹⁵⁾. Hal ini didukung pula oleh adanya mutasi p53 pada sel T47D sehingga protein tersebut telah kehilangan fungsinya⁽³⁵⁾. Protein yang terlibat pada fase G₁ seperti p53, p21 dan pRb memegang peranan untuk mencegah terjadinya hiperploidi pada sel kanker^(44,45).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kurkumin mampu memodulasi terjadinya hiperploidi pada sel T47D. Beberapa sel kanker payudara seperti T47D, MDA-MB-468 dan BT-20 dengan karakter mutasi pada p53, pada induksi konsentrasi rendah dengan senyawa antimikrotubul seperti nokodazol dan vinkristin terbukti menyebabkan ketiga sel berada pada *mitotic arrest*. Perlakuan dengan konsentrasi tinggi terhadap ketiga sel tersebut menyebabkan sel mengalami G₁ dan G₂-M *arrest*. Pada perlakuan konsentrasi tinggi tersebut diikuti pula dengan peningkatan ekspresi protein p21⁽⁴⁶⁾. Pada percobaan ini kurkumin yang digunakan termasuk tingkat konsentrasi rendah. Kurkumin, kemungkinan mengikuti model mekanisme tersebut. Hal ini ditunjukkan dengan gagalannya kurkumin menyebabkan terjadinya G₁ dan G₂ *arrest*. Hal ini didukung pula dengan tidak adanya peningkatan ekspresi p21 pada perlakuan kurkumin konsentrasi rendah. Aktivasi Cdc-2 oleh kurkumin, menyebabkan sel memasuki fase mitosis secara prematur dan terjadi pula penggandaan DNA secara prematur. Hal tersebut diikuti dengan *mitotic arrest* dan diikuti dengan kematian sel yang dikenal pula dengan

mitotic catastrophe. Salah satu ciri khas dari proses kematian sel ini adalah adanya aktivasi abnormal kompleks Cdc2-2/Cyclin B⁽²²⁾. Senyawa-senyawa antimikrotubul menunjukkan karakteristik serupa⁽⁴²⁾.

Perlakuan dengan analog kurkumin PGV menunjukkan adanya peningkatan ekspresi p21 dan aktivasi Cdc-2 pada sel dan terjadi penghambatan siklus sel pada fase G₂-M dan diikuti adanya hiperploidi setelah perlakuan 24 jam. PGV-1 menunjukkan efek penghambatan yang lebih besar dibanding PGV-0 dan ditandai pula adanya akumulasi sel pada fase G₂-M dengan adanya peningkatan ekspresi protein p21 mulai jam ke-24 dan adanya peningkatan jumlah sel hiperploidi dengan adanya aktivasi Cdc-2 (Tabel 2).

Sel kanker payudara dikelompokkan menjadi dua: a) sensitif terhadap nokodazol (suatu senyawa antimikrotubul), antara lain adalah sel MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-352, sel tersebut mengalami peningkatan indeks mitosis setelah perlakuan dengan nocodazole (*mitotic arrest*) dan b) memiliki respon lemah terhadap nokodazol antara lain: T47D, MDA-MB-468 dan ZR-75-10⁽⁴⁶⁾. Ketiga sel tersebut memiliki kesamaan mutasi pada p53, sehingga protein tersebut kehilangan fungsinya. Induksi senyawa antimikrotubul terhadap ketiga sel

tersebut sangat tergantung kepada tingkat konsentrasi senyawa uji. Perlakuan dengan konsentrasi rendah menyebabkan sel mengalami *mitotic arrest* dan pada perlakuan konsentrasi tinggi menyebabkan sel mengalami G₁ dan/atau G₂ *arrest* diikuti dengan adanya peningkatan ekspresi p21.

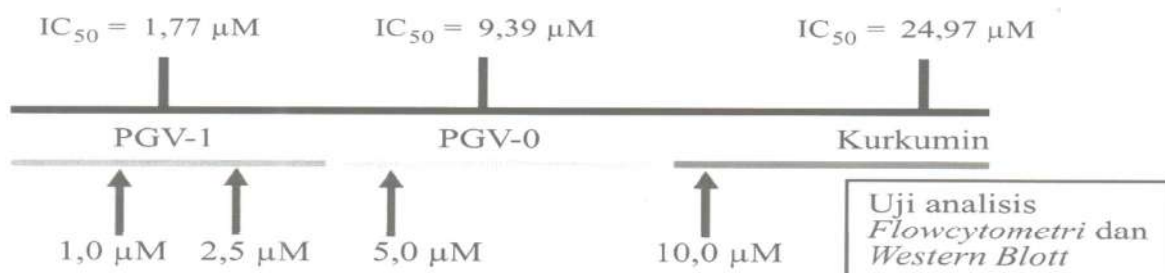
Berdasarkan nilai IC₅₀ hasil uji sitotoksitas dan tingkat konsentrasi yang diujikan untuk analisis siklus sel, maka tingkat konsentrasi uji PGV-1 pada konsentrasi 1,0 µM termasuk pada konsentrasi lebih rendah dibanding nilai IC₅₀ sedangkan konsentrasi 2,5 µM termasuk tingkat konsentrasi yang tinggi (Gambar 4). Pengujian dengan kurkumin dan PGV-0 termasuk tingkat konsentrasi rendah. Berdasarkan skema uji tersebut, terlihat bahwa PGV-1 konsentrasi tinggi menyebabkan sel mengalami peningkatan ekspresi p21. Adanya hiperploidi menunjukkan adanya kelainan pada proses mitosis. Pembelahan sel yang tidak sempurna menyebabkan sel keluar dari mitosis dan sel terakumulasi pada fase "seperti G₁" dengan multinukleus⁽⁴⁷⁾. Ekspresi tinggi p21 mulai jam ke-24 menyebabkan terjadinya *arrest* sel pada fase "seperti G₁" dan fase G₂-M. Pada konsentrasi rendah sel tidak mengalami G₂-M *arrest* akan tetapi sel mengalami *mitotic arrest* (serupa dengan kurkumin).

Tabel 2. Persentase tingkat perubahan relatif terhadap sel kontrol sel T47D dengan perlakuan PGV-1, PGV-0 dan kurkumin pada berbagai fase siklus sel dan perubahan tingkat ekspresi protein p21 dan Cdc-2 terfosforilasi.

Perlakuan	Analisis <i>flowcytometric</i>				Analisis <i>Western blot</i>	
	Sub G ₁	G ₁	G ₂ -M	Hiperploidi	P21	Cdc-2p
PGV-1 2,5 µM 12	19,90	-95,03	147,83	-6,69	Tidak dilakukan	
PGV-1 2,5 µM 24	104,13	-96,34	47,32	240,31	+++	***
PGV-0 5,0 µM 12	19,42	-2,29	6,65	38,08	Tidak dilakukan	
PGV-0 5,0 µM 24	-15,29	-5,15	16,71	29,74	++	*
Kur 10,0 µM 12	-20,15	-21,44	-50,56	50,19	Tidak dilakukan	
Kur 10,0 µM 24	13,35	11,60	-36,80	69,67	*	*

Keterangan:

+ (peningkatan), * (penurunan), persentase relatif = (Co-Un)/Co x 100%. Co = persentase populasi sel pada perlakuan kontrol, Un = perlakuan dengan senyawa uji.



Gambar 4. Nilai IC₅₀ senyawa uji dan konsentrasi senyawa uji terhadap sel kanker payudara pada pengamatan regulasi siklus sel (analisis *flowcytometric* dan *Western blot*. (Keterangan: tidak dilakukan analisis *Western blot* untuk PGV-1 konsentrasi 1,0 µM).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa perlakuan dengan senyawa antimikrotubul menyebabkan sel keluar dari mitosis dan memasuki kembali fase G_1 tanpa terjadinya pembelahan yang sempurna yang dikenal dengan istilah *mitotic slippage*⁽⁴⁸⁾. Pada kondisi normal sel tersebut akan dipacu untuk *arrest* pada G_1 karena adanya kelainan kandungan DNA. Akan tetapi dengan terjadinya mutasi p53 berakibat pada gagalnya kontrol *checkpoint* pada G_1 ini sehingga sel dengan kandungan DNA 4N memasuki fase S dan terjadi endoduplikasi. Hal ini ditunjukkan pula dengan adanya aktivasi Cdc-2 yang menyebabkan sel memasuki fase mitosis dengan kelainan kandungan DNA dan sebagai konsekuensinya terjadi hiperploidi sel^(22,42).

Protein-protein yang terlibat pada *checkpoint* fase G_1 seperti pRb, p53 dan p21 memegang peran penting untuk mencegah terjadinya hiperploidi ini. Mutasi p53 ini sangat mempengaruhi adanya hilangnya kemampuan *checkpoint* pada fase G_1 akan tetapi sel masih dapat mengalami *arrest* pada fase G_2 . Hal ini dibuktikan dengan adanya ekspresi tinggi p21 setelah perlakuan PGV-1 jam ke 24 yang memacu terjadinya akumulasi sel pada fase G_2 -M dan tidak terjadi *arrest* pada fase G_1 normal (2N). Hasil ini mengindikasikan pula bahwa ekspresi tinggi p21 saja tidak mampu untuk mencegah sel mengalami hiperploidi. Hal ini ditunjukkan pula dengan adanya aktivasi Cdc-2 sehingga sel tetap memasuki fase mitosis dan terjadi hiperploidi. Berdasarkan analisis tersebut terlihat bahwa PGV-1 memiliki efek paling kuat dibanding kedua senyawa uji lainnya. Aktivitas antikanker kurkumin, PGV-0 dan PGV-1 memiliki mekanisme yang sama dengan obat-obatan antimikrotubul. Obat-obatan antimikrotubul memacu terjadinya hiperploidi sel dan diikuti dengan proses apoptosis pada sel tersebut^(22,41,44).

Analisis pengaruh perlakuan kurkumin dan PGV terhadap apoptosis sel. Induksi apoptosis pada sel T47D oleh senyawa kurkumin, PGV-1 dan PGV-0 terjadi melalui aktivasi Caspase-3/7 tidak melalui aktivasi Caspase-8 (Gambar 4). Apoptosis terjadi melalui pelepasan sitokrom C mitokondrial yang memacu terbentuknya apoptosom (kompleks Apaf1 dan proCaspase-9) untuk memacu terjadinya apoptosis melalui aktivasi Caspase-9 yang ditandai dengan adanya pemotongan Caspase-9^(33,49). Beberapa penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa induksi apoptosis oleh senyawa-senyawa antimikrotubul menyebabkan terjadinya hiperfosforilasi Bcl-2. Hal ini menyebabkan Bcl-2 anti apoptotik tidak mampu membentuk dimer dengan Bax dan memacu dilepaskannya sitokrom C dari mitokondria tanpa

melibatkan protein p53⁽⁵⁰⁾.

Penelitian sebelumnya menunjukkan aktivasi Caspase-3/7 terjadi mulai jam ke-12 dan diikuti dengan adanya pemotongan PARP⁽⁷⁾. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian yang menunjukkan adanya fosforilasi Bcl-2 mulai pada jam ke-3, pada sel MCF-7 dengan perlakuan senyawa antimikrotubul vinorelbine dan estramustin. Fosforilasi tersebut mendahului terjadinya peristiwa apoptosis pada sel tersebut⁽⁴⁰⁾. Penelitian serupa menggunakan vinkristin dan paklitaxel menunjukkan adanya hiperfosforilasi Bcl-2 mulai jam ke-6 dan diikuti dengan aktivasi Caspase-3 dan pemotongan PARP pada jam ke-12, peristiwa ini terjadi mendahului terjadinya fragmentasi DNA⁽⁵⁰⁾.

Mekanisme fosforilasi Bcl-2 belum sepenuhnya ditemukan, secara umum fosforilasi Bcl-2 tersebut melibatkan protein kinase. Penelitian yang lain menunjukkan terjadinya fosforilasi Bcl-2 pada sel oleh senyawa antimikrotubul terkait dengan kontrol mitosis pada sel^(42,51). Kedua kelompok peneliti menunjukkan bahwa hiperfosforilasi Bcl-2 terjadi pada saat sel memiliki mitotik indeks yang tinggi pula. Hal yang sama dari hasil kedua kelompok peneliti menunjukkan bahwa fosforilasi Bcl-2 terjadi mendahului peristiwa apoptosis. Hal ini menimbulkan dugaan bahwa fosforilasi Bcl-2 kemungkinan merupakan sinyal awal untuk terjadinya apoptosis pada sel dengan perlakuan senyawa antimikrotubul.

Fosforilasi Bcl-2 terjadi pada serin-70 dan serin-80⁽⁵²⁾, hal ini menimbulkan dugaan bahwa fosforilasi Bcl-2 terkait dengan aktivasi kompleks Cyclin-B/Cdc-2 kinase yang merupakan serin kinase⁽⁴²⁾. Pengamatan menggunakan olomusin (inhibitor spesifik Cyclin-B/Cdc-2 kinase) menunjukkan tidak adanya perubahan pada jumlah sel yang mengalami apoptosis dan hanya berpengaruh pada jumlah sel yang memasuki fase mitosis⁽⁵³⁾. Pada percobaan kali ini terjadi aktivasi Cdc-2 pada sel T47D dengan perlakuan senyawa uji pada jam ke-24. Aktivasi Caspase pada pengamatan kami sebelumnya menunjukkan terjadi mulai jam ke-12⁽⁷⁾. Hasil tersebut membuktikan aktivasi Cdc-2 tidak terkait dengan induksi apoptosis pada tahap awal. Hal ini didukung pula bahwa Bcl-2 bukan merupakan substrat Cyclin-B/Cdc-2 kinase secara *in vitro*⁽⁵⁴⁾. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa terjadinya penghambatan sel T47D pada fase G2-M oleh senyawa PGV-1 tidak terkait dengan induksi proses apoptosis⁽⁵⁵⁾.

Mekanisme induksi apoptosis oleh senyawa uji dimungkinkan pula melalui peningkatan ekspresi protein p21. Protein p21 dapat memacu terjadinya apoptosis tanpa tergantung p53 pada sel kanker.

Induksi apoptosis oleh p21 terjadi melalui jalur yang berbeda dengan jalur apoptosis melalui p53^(56,57). Efek proapoptotik p21 telah dibuktikan pada kombinasi perlakuan paklitaxel (antimikrotubul) dengan manumisin yang menginduksi apoptosis melalui jalur aktivasi Caspase-3⁽⁵⁸⁾. Peningkatan ekspresi p21 mampu menekan α B kristalin yang mencegah maturasi Caspase-3⁽⁵⁹⁾. Mekanisme aktivasi Caspase-3 dan Caspase-7 dimungkinkan pula terjadi melalui aktivasi Caspase-2. Senyawa antimikrotubul (dokotaksel yang merupakan golongan taksan), mampu menginduksi terjadinya apoptosis pada sel melanoma melalui mekanisme aktivasi Caspase-2⁽⁶⁰⁾. Aktivasi Caspase-2 terjadi melalui jalur mitokondrial dan jalur non-mitokondrial. Aktivasi Caspase-2 pada sel kanker kolon dengan perlakuan resveratrol mengindikasikan adanya aktivasi Caspase-2 tanpa melalui jalur mitokondrial⁽⁶¹⁾. Caspase-2 termasuk inisiator Caspase yang diaktivasi oleh beberapa jalur antara lain oleh adanya kerusakan DNA^(61,62).

SIMPULAN

Senyawa kurkumin (10 μ M), PGV-0 (5,0 μ M) dan PGV-1 (2,5 μ M) dapat menghambat pertumbuhan sel T47D melalui jalur penghambatan siklus sel dengan mengakumulasi hierploidi sel melalui aktivasi Cdc-2 dan induksi apoptosis melalui aktivasi Caspase-3/7. Penghambatan pertumbuhan sel T47D oleh senyawa kurkumin, PGV-0 dan PGV-1 tergantung pada konsentrasi. PGV-1 (2,5 μ M) memiliki potensi paling kuat dalam menghambat pertumbuhan sel T47D, diawali dengan penghambatan siklus sel pada fase G₂-M. PGV-0 (5,0 μ M) dan PGV-1 (2,5 μ M) mampu meningkatkan ekspresi p21 yang memacu terjadinya akumulasi sel pada fase G₂-M, sementara kurkumin (10,0 μ M) tidak mempengaruhi ekspresi p21.

SARAN

Aktivitas antikanker senyawa analog kurkumin (khususnya PGV-1) perlu diuji secara *in vivo*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih disampaikan kepada Mrs. Sachiko Iida yang telah memberikan dukungan untuk pelaksanaan penelitian ini di *Nara Institut of Science and Technology*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aggarwal BB, Kumar A, Bharti AC. Anticancer potential of curcumin: Preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2003.23(1a):363-98.
- Reksohadiprodjo MS. *et al.*, 2004, United States Patent, No: Us 6,777,447 B2, Date: Aug 17 2004.
- Tim Molnas Fakultas Farmasi UGM. Buku III: Laporan penelitian bidang farmakologi proyek Molnas. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM; 2001. F
- Da'i M. Aktivitas antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel Raji, sel Hela dan sel Myeloma [thesis]. Yogyakarta: Program Pascasarjana UGM; 2003.
- 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):40-7.
- Da'i M, Meiyanto E, Supardjan AM, Jenie UA, Kawaichi M. Potensi antiproliferatif analog kurkumin pentagamavunon terhadap sel kanker payudara T47D. *Artocarpus.* 2007.7(1):14-20.
- Da'i M, Jenie UA, Supardjan AM, Kawaichi M, Meiyanto E. T47D cells arrested at G₂-M and hyperploidy formation induced by a curcumin's analogue PGV-1. *Biotechnology.* 2007.12(2):1005-12.
- Meiyanto E, Melannisa R, Da'i M. PGV-1 menurunkan ekspresi faktor angiogenesis (VEGF dan COX-2) pada sel T47D terinduksi estrogen. *Majalah Farmasi Indonesia.* 2006.17(1):1-6.
- Da'i M, Meiyanto E, Supardjan AM. Efek antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel Myeloma. *Jurnal Sains Kesehatan.* 2004.17(1):1-12.
- Meiyanto E, Supardjan AM, Da'i M, Agustina D. Efek antiproliferatif pentagamavunon-0 terhadap sel kanker payudara T47D. *Jurnal Kedokteran YARSI.* 2006.14(1):011-5.
- Meiyanto E. Kurkumin sebagai obat anti kanker: Menelusuri mekanisme aksinya. *Majalah Farmasi Indonesia.* 1999.10(4):224-36.
- Shao Z, Shen Z, Liu C, Sartippour MR, Go VL, Heber D, Nguyen M. Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2000.98:234-40.
- Meiyanto E. Efek antiproliferatif dan antimetastatik tulang pentagamavunon-0 terhadap kanker payudara. Laporan RUT X Kementerian Ristek RI. 2004.
- Choudhuri T, Pal S, Munna L, Aggarwal BB, Dasa T, Saa G. Curcumin induces apoptosis in human breast cancer cells through p53-dependent Bax induction. *FEBS Letters.* 2002.512:334-40.
- Choudhuri T, Pal S, Das T, Saa G. Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G₂ phase of cell cycle in a p53-dependent manner. *J Biol Chem.* 2005.280:20059-68.
- Mukhopadhyay A, Banerjee S, Stafford LJ, Xia C, Liu M, Aggarwal BB. Curcumin-induced suppression of cell proliferation correlates with down-regulation of Cyclin D1 expression and Cdj4-mediated retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogen.* 2001.21(57):8852-61.
- Holy JM. Curcumin disrupts mitotic spindle structure and induces micronucleation In MCF-7 Breast Cancer Cells. *Mutat Res.* 2002.518:71-84.

18. Tsuiki H, Nitta M, Tada M, Inagaki M, Ushio M, Saya H. Mechanism of hyperploidy cell formation induced by microtubule inhibiting drug in glioma cell lines. *Oncogen*. 2001.20:420-9.
19. Wosikowski J, Regis JT, Robey RW, Alvarez M, Buters JTM, Gudas JM, Bates SE. Normal p53 status and function despite the development of drug resistance in human breast cancer cells. *Cell Growth Different*. 1995.6:1395-1403.
20. Long BH, Fairchild CR. Paclitaxel inhibits progression of mitotic cells to G₁ phase by interference with spindle formation without affecting other microtubule functions during anaphase and telophase. *Cancer Res*. 1994.54:4355-61.
21. Sorger PK, Dobles M, Tournebize R, Hyman AA. Coupling Cell Division and Cell Death to Microtubule Dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 1997. 9: 807-14
22. Okada H, Mak TW. Pathways of apoptosis and non apoptotic death in tumour cells. *Cancer*. 2004.4:592-603.
23. Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG, Myt1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc-2 on tyrosine-15. *Science*. 1995.270:86-90.
24. Liu F, Stanton JJ, Wu Z, Piwnica-Worms H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14. *Mol Cell Biol*. 1997.17:517-83.
25. Parker LL, Piwnica-Worms H. Inactivation of the p34cdc2-Cyclin B complex by the human weel tyrosine kinase. *Science*. 1992.257:1955-7.
26. Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 1991.67:207-11.
27. Schwartz GK, Shah MA. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2005.23:9408-21
28. Polyak K, Lee MH, Erdument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27kip1, a Cyclin dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell*. 1994.78:56-66.
29. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai L, Zhang P, Dobtowski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, Fox MP, Wei N. Inhibition of cyclin dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995.6:387-400.
30. Chibazakura T, McGrew SG, Cooper JA, Yoshikawa, Roberts JM. Regulation of Cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27 and p107. *PNAS*. 2004. 101: 4465-70.
31. Notton E, Diffley FX. Cdk Inactivation is the only essential function of the Apc/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. *Mol. Cell*. 2000.5:85-95.
32. Cryns V, Yuan J. Protease to die. *Genes Dev*. 1998.12: 1551-70.
33. Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001.98:2603-19.
34. O'connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Fien S, Fornace AJ, Kihn KW. 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*. 1997.57:4285-300.
35. Schafer JM, Lee ES, O'regan RM, Yao K, Jordan VC. Rapid development of tamoxifen-stimulated mutant p53 breast tumors (T47D) in athymic mice. *Clin Cancer Res*. 2000.6:4373-80.
36. Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer. An update. *Endocrine-Related Cancer*. 2006. 13:293-325.
37. Lu X, Errington J, Curtin NJ, Lunec J, Newell DR. The impact of p53 status on cellular sensitivity to antifolate drugs. *Clin Cancer Res*. 2001.7:2114-23.
38. Yu Q, Rose JH, Zhang H. Ucn-01 inhibits p53 upregulation and abrogates gamma radiation-induced G₂-M checkpoint independently of p53 by targeting both the checkpoint kinases, Chk2 and Chk1. *Cancer Res*. 2002.62:5743-8.
39. Loo GV, Saelens X, Van Gurp M, Macfartana M, Martin SJ, Vandenabeele P. The role of mitochondrial factors in apoptosis: A Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death And Differentiation*. 2002.9:1031-42.
40. Wang TH, Popp DM, Wang HS, Saitoh M, Mural IG, Henley DC. 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*. 1999.274:8208-16.
41. Nitta M, Tsuiki H, Arima Y, Harada K, Nishizaki T, Sasaki K, Tatsuyuki M, Mimori T, Ushio Y, Saya H. Hyperploidy induced by drugs that inhibit formation of microtubule promotes chromosome instability. *Genes Cells*. 2002.7:151-62.
42. Wang TH, Wang HS, Soong YK. Paclitaxel induced cell death: Where the cell cycle and apoptosis come together. *Cancer*. 2002.11:2619-28.
43. Yu Q, Geng Y, Sicinski P. Specific protection against breast cancer by Cyclin D1 ablation. *Nature*. 2001.411:1017-21.
44. Stewart ZA, Tang LJ, Pietenpol JA. Increased p53 phosphorylation after microtubule disruption is mediated in a microtubule inhibitor and cell-specific manner. *Oncogen*. 2001.20:113-21.
45. Mantel C, Braunn SE, Reid S. p21(Cip1/Waf1) deficiency caused deformed nuclear architecture, centriole overduplication, polyploidy, and relaxed microtubule damage checkpoints in human hematopoietic cells. *Blood*. 1999.93:1390-8.
46. Blajeski AL, Phan Vy A, Kottke TJ, Kauffmann SH. G₁ and G₂ cell cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. *JCI*. 2002.110:91-9.

47. Lin HI, Chang YF, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Submicromolar paclitaxel induces apoptosis in human gastric cancer cells at early G₁ phase. *Anticancer Res.* 1998;18:3443-9.
48. El-Hajouji A, Cunha M, Kirsch-Volders M. Spindle poison can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleates in the cytokinesis block assay. *Mutagenesis.* 1998;13:193-8.
49. Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Canc Ther.* 2003;2:573-80.
50. Srivastava RK, Srivastava AR., Korsmeyer SI, 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;18:3509-17.
51. Mohan J, Gandhi AA, Bhavyam BC, Rashmi R, Karunakaran D, Indu R, Sarithoskumar R. Caspase-2 triggers Bax-Bak-dependent and independent cell death in colon cancer cells treated with resveratrol. *J Biol Chem.* 2006;281:17599-611.
52. Blagosklonny MV, Fojo T. Molecular effects of paclitaxel: Myths and reality (A critical review). *Int J Can.* 1999;83:151-6.
53. Masuda A, Maeno K, Nakagawa T, Saito H, Takahashi T. Association between mitotic spindle checkpoint impairment and susceptibility to the induction of apoptosis by antimicrotubule agent in human lung cancer. *American J Pathol.* 2003;163:1109-16.
54. Scatena CD, Stewart ZA, Mays D, Tang LJ, Keefer CJ, Leach SD, Petenpol JA. Mitotic phosphorylation of Bcl-2 during normal cell cycle progression and taxol induced growth arrest. *J Biol Chem.* 1999;273:30777-84.
55. Da'I M, Supardjan AM, Jenie UA, Kawaichi M. Pentagamavunon-1 menghambat siklus sel T47D terinduksi Caspase inhibitor Z-VAD-Fmk pada fase G₂-M. *Jurnal Farmasi Indonesia.* 2011;5(4):180-7.
56. Ramondetta L, Mills GB, Burke TW, Wolf JK. Adenovirus mediated expression of p53 and p21 in a papillary serous endometrial carcinoma cell line (Spec-2) results in both growth inhibition and apoptotic cell death: Potential application of gene therapy to endometrial cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6:278-84.
57. Wu Q, Kirschmeier P, Hockenberry T, Yang TY, Brassard DL, Wang L, McLanahan T, Black S, Rizzi G, Musco ML, Miza A, Liu S. Transcriptional regulation during p21 waf1/Cip1-induced apoptosis in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem.* 2001;276:36329-37.
58. Yang HL, Pan JX, Sun L, Yeung SCJ. p21 Waf-1 (Cip-1) enhances apoptosis induced by manumycin and paclitaxel in anaplastic thyroid cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;88:763-72.
59. Kamradt MC, Chen F, Cryns VL. The small heat shock protein Ab-crystallin negatively regulates cytochrome C and Caspase-8 dependent activation of Caspase-3 by inhibiting its autoproteolytic maturation. *J Biol Chem.* 2001;276:16059-63.
60. Mhaidat NM, Wang Y, Kiejda KA, Zhang XD, Hersey P. Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of Caspase-2. *Mol Canc Ther.* 2007;6:752-61.
61. Ho PK, Hawkins CJ. Mammalian initiator apoptosis caspases. *FEBSJ.* 2005. 272: 5436-53.
62. Zhivotovsky B, Orrenius S. Caspase-2 function in response to DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:859-67.