Efek sitotoksik dan antiproliferasi dari gamavuton-0 pada kultur sel Leukemia basofilik tikus

The cytotoxic and antiproliferative effects of gamavuton-0 in rat basophilic Leukemia cells

Agung Endro Nugroho [1*], Sardjiman [2] dan Kazutaka Maeyama [3]
[1] Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM
[2] Bagian Kimia Farmasi Fakultas Farmasi UGM
[3] Department of Pharmacology, Informational Biomedicine, School of Medicine, Ehime University Japan

Abstrak

Gamavuton-0 (GVT-0) merupakan suatu senyawa analog 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on dari kurkumin, dan mempunyai nama kimia 1,5-*bis*(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on. GVT-0 dan kurkumin mempunyai gugus hidroksi dan gugus metoksi pada rantai aromatiknya, perbedaannnya hanya pada kerangka tengahnya. Kurkumin merupakan senyawa antikarsinogenik yang relatif poten. Kurkumin mampu memacu proses apoptosis pada sel Leukemia manusia. Penelitian ini mempelajari akvititas sitotoksis dan antiproliferasi dari GVT-0 pada kultur sel leukemia basofilik tikus. Pengukuran viabilitas sel menggunakan metode WST-1. Pada prinsipnya, garam tetrazolium dipecah oleh enzim seluler dari sel hidup menjadi produk formazan. Produk tersebut diukur absorbansinya dengan metode kolorimetri menggunakan microplate (ELISA) reader pada panjang gelombang 450 nm

Pada penelitian ini, GVT-0 menurunkan viabilitas sel setelah 24 jam inkubasi, dan efek sitotoksik tersebut bersifat tergantung dosis. Namun demikian, potensi sitotoksisitas GVT-0 (IC_{50} : 43,67 μM) lebih rendah dibandingkan dengan kurkumin (IC_{50} : 29,14 μM). Disamping itu, GVT-0 juga menurunkan kandungan histamin dan enzim β-heksoaminidase pada sel. GVT-0 (1 μM) juga menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel yang bermakna setelah 48 dan 72 jam inkubasi. Hal tersebut mengindikan bahwa GVT-0 dapat memperpanjang waktu penggandaan sel. Hasil penelitian ini memberikan informasi mengenai senyawa hasil sintesa yang berpotensi dikembangkan sebagai senyawa antikarsinogenik.
Kata kunci : gamavuton-0, kurkumin, kanker, sitotoksik, antiproliferasi

Abstract

Gamavuton-0 (GVT-0), also named as 1,5-bis(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one is a 1,5-diphenyl-1,4-pentadiene-3-one analog of curcumin by modifying the center site of curcumin leading to 1,4-pentadiene-3-ones to maintain the hydroxy moiety at aromatic rings which are responsible for its biological activities. Curcumin has been reported to have potent anticarcinogenic effects. Besides, curcumin was found to induce apoptosis in human Leukemia cells. In our study, we investigated the cytotoxic and antiproliferative effects of gamavuton-0 in rat basophilic leukemia cells. Cell viability was determined by WST-1 assay. In brief, tetrazolium salts were cleaved to formazan by cellular enzymes of viable cells, determined by colorimetric methods with a microplate (ELISA) reader at 450 nm.

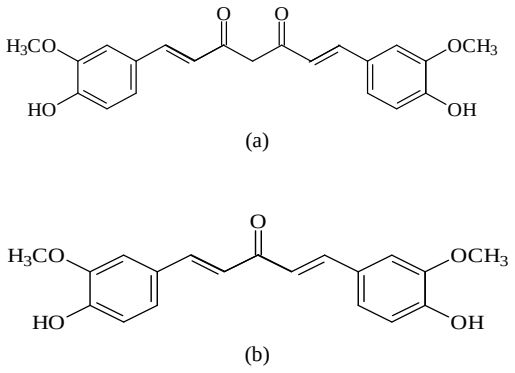
In the present study, we evaluated cytotoxic and proliferative effects of GVT-0 in rat basophilic leukemia cells. In the study, GVT-0 induced rat basophilic leukemia cells death in a dose-dependent manner after overnight incubation. GVT-0 also impaired the content of histamine and β-hexoaminidase

enzyme in cells. However, the cytotoxic effect of GVT-0 (IC_{50} : 43,67 μM) was less potent than this of curcumin (IC_{50} : 29,14 μM). GVT-0 (1 μM) also showed a significant inhibition of cell growth after 48 and 72 hr. Its fact indicates that GVT-0 could prolong the cells doubling time. These results provide useful information to guide the development of new synthetic compounds for the treatment of cancer diseases.
Key words : gamavuton-0, curcumin, cancer, cytotoxic, antiproliferative,

Pendahuluan

Gamavuton-0 (GVT-0) atau 1,5-*bis*(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on (Gambar 1) merupakan salah satu analog benzilidin aseton dari kurkumin (Reksohadiprodjo *et al.,* 2004). Secara alami, senyawa tersebut diisolasi dari rimpang *Curcuma domestica* (Masuda *et al*., 1993) dan *Curcuma longa* L. (Park and Kim, 2002). Senyawa tersebut mirip dengan kurkumin karena keduanya mempunyai gugus hidroksi dan gugus metoksi pada rantai aromatiknya. Perbedaannnya, GVT-0 mempunyai kerangka 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-o sedangkan kurkumin mempunyai 1,7-difenil-1,6-heptadien-3,5-dion (Reksohadiprodjo *et al*., 2004). Modifikasi kurkumin menjadi GVT-0 bertu-juan memperbaiki stabilitas kurkumin, yang dipengaruhi oleh pH dan cahaya. Pada struktur kimia GVT-0, hilangnya gugus metilen dan gugus karbonil menjadi 1,4-pentadien-3-on, menghasilkan suatu senyawa yang lebih stabil dibandingkan dengan kurkumin (Tonnesen and Karlsen, 1985).

Kurkumin merupakan senyawa antikarsinogenik yang relatif poten. Kurkumin memacu apoptosis melalui aktivasi enzim caspase dan down-regulation gen/protein anti-apoptosis. Kurkumin juga menghambat proses inisiasi, promosi dan metastatis tumor. Di samping itu, kurkumin menunjukkan aktivitas antiproliferasi pada berepara jenis sel kanker. Aktivitas antikanker kurkumin tersebut berkaitan dengan penghambatan pada faktor transkripsi sel kanker (NF-κB, AP-1. $STAT_3$), ekspresi gen (COX-2, iNOS), jalur protein kinase (JAK_2, TYK_2) atau enzim yang terlibat (XO, FTPase) (Shishodia *et al*., 2005; Anand *et al*., 2008). Kurkumin juga menunjukkan aktivitas yang poten pada promosi antitumor dan apoptosis pada kultur sel leukemia manusia (HL-60) melalui penekanan ekspresi Bcl-2 (Kuo *et al*., 1996). Aktivitas antikanker kurkumin diduga kuat berkaitan dengan rigiditas 2 cincin aromatik yang simetris beserta gugus-gugus pada rantai aromatik tersebut (Woo *et al*., 2005). Di lain pihak, GVT-0 yang merupakan analog benzilidin aseton dari kurkumin, serta masih mempunyai gugus hidroksi dan gugus metoksi pada rantai aromatiknya diharapkan juga mempunyai aktivitas antikanker seperti halnya kurkumin. Pada penelitian ini, GVT-0 dievaluasi aktivitas sitotoksik maupun antiproliferasi pada kultur sel leukemia basofilik tikus.



Gambar 1. Struktur kimia dari kurkumin (a) dan senyawa GVT-0 (b)

Metodologi

Bahan

Bahan uji utama dalam penelitian ini adalah GVT-0 yang diperoleh melalui sintesis oleh Dr. Sardjiman, MS., Apt (Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM). *Eagle's minimum essential medium* (MEM) dan antibiotika (penisilin dan streptomisin) diperoleh dari Gibco (Grand Island, NY, USA). Fetal Calf Serum (FSC) diperoleh dari JRH Biosciences (Kansas, USA), sedangkan Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) diperoleh dari Dosindo (Kumamoto Japan). Reagen WST-1 yang dipergunakan untuk uji proliferasi sel dan sitotoksisitas diperoleh dari Roche Diagnotics (Mannheim, Germany).

Cara kerja

Uji Sitotoksisitas

Suspensi sel RBL-2H3 (Department of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University Japan) dalam medium MEM sebanyak 100 μL dengan kepadatan 1,25 x 10^5 sel/sumuran, dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran. Kemudian *plate* ditambahkan sampel 100 μL dalam medium MEM pada tiap sumuran yang berbeda sehingga diperoleh kadar akhir sebesar 0,1; 1, 10 dan 100 μM. Untuk kelompok kontrol hanya ditambahkan 100 μL medium MEM. Setelah itu, *plate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C dalam inkubator CO_2 5 %. Setelah 24 jam inkubasi, pada *plate* 96 sumuran ditambahkan 10 μL reagen WST-1 pada tiap sumuran, kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37° C dalam inkubator CO_2 5%. Sel yang masih hidup akan bereaksi dengan reagen WST-1 menghasilkan produk formazon berwarna merah. Absorbansi dibaca dengan menggunakan microplate (ELISA) reader (Shimadzu) pada panjang gelombang 450 nm.

Uji Antiproliferasi

Suspensi sel RBL-2H3 dalam medium MEM sebanyak 100 μL dengan kepadatan 2 x 10^4 sel/sumuran, dimasukkan ke dalam *plate* 96 sumuran. Selanjutnya, uji antiproliferasi dilakukan seperti pada uji sitotoksisitas namun hanya dilakukan menggunakan satu konsentrasi GVT-0 (1 μM), dan pengamatan dilakukan pada jam ke 0, 24, 48 dan 72.

Penetapan kadar histamin

Pada uji sitoksisitas, setelah tahap 24 jam inkubasi, kemudian medium sel dicuci 2 kali dengan menggunakan PIPES dan ditetapkan kandungan histamin dan enzim β-hexosaminidase. Kadar histamin ditetapkan dengan menggunakan HPLC dengan detektor fluorometri mengacu pada metode Yamatodani (1985). Sebanyak 50 μL supernatan dan homogenat sel dinjeksikan pada kolom TSKgel SP-2SW cation Exchanger (Tosoh, Tokyo). Fase gerak HPLC yang digunakan adalah : larutan dapar kalium fosfat 0,25 M dan larutan *o*-phthalaldehyde dalam kondisi alkali. Deteksi fluorometri dilakukan pada panjang gelombang eksitasi 360 nm dan emisi 450 nm.

Penetapan enzim β-hexosaminidase

Pada penetapan enzim β-hexosaminidase, supernatan sebanyak 50 μL diinkubasi dengan 2,5 mM *p*-nitrofenil-2-Acetamido-2-deoksi-β-D-glukop-iranosida 100 μL (dalam 50 mM larutan dapar natrium sitrat pH 4,5) selama 1 jam pada suhu 37° C. Setelah itu, sebanyak 20 μL 2M KOH/ 1 M KH_2PO_4 ditambahkan pada campuran larutan tersebut, dan kemudian aktivitas enzim β-hexosaminidase ditetapkan menggunakan analisis kolorimetri dengan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis data

Potensi aktivitas sitotoksisitas direpresen-tasikan sebagai harga IC_{50} yang dihitung menggunakan analisis probit. Semakin kecil harga IC_{50} maka potensi sitotoksisitasnya semakin besar. Harga tersebut merupakan nilai konsentrasi yang menghasilkan toksisitas (kematian) pada sel sebesar 50 %. Perhitungan harga IC_{50} berdasarkan hubungan regresi linier antara logaritma konsentrasi vs. nilai probit dari prosentase viabilitas sel akibat perlakuan senyawa GVT-0 atau kurkumin. Penetapan harga IC_{50} dilakukan dengan analisa probit menggunakan piranti lunak SPSS versi 10.00.

Prosentase viabilitas sel = [B-C/A-C] x 100 %

A : absorbansi (WST-1 test) pada kelompok kontrol

B : absorbansi (WST-1 test) pada kelompok perlakuan

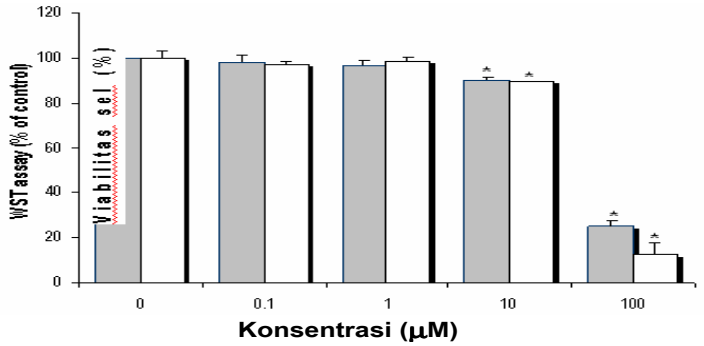
C : absorbansi reagen WST-1

Semua data disajikan dalam bentuk mean ± SEM. Analisa statistika menggunakan one-way analysis of variance (ANOVA), dilanjutkan dengan uji Least Significant Difference (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95 %.

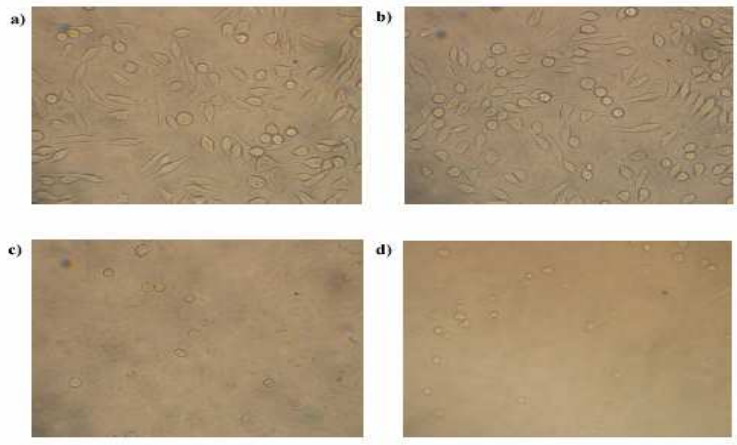
Hasil dan Pembahasan

Uji sitotoksisitas GVT-0 terhadap sel RBL-2H3

Hasil uji sitotoksisitas senyawa GVT-0 pada kultur sel RBL-2H3 selama 24 jam disajikan pada Gambar 2. Pada penelitian ini juga dilakukan uji serupa terhadap kurkumin sebagai pembanding. Lebih lanjut, kedua senyawa tersebut dibandingkan potensi sitotoksisitasnya. Perlakuan GVT-0 maupun kurkumin menunjukkan aktivitas sitotoksik secara bermakna secara bermakna ($P<0.05$) pada konsentrasi 10 μM. Pada konsentrasi tersebut, kedua senyawa mampu menurunkan viabilitas sel sebesar 10 %. Pada konsentrasi yang tinggi (100 μM), GVT-0 dan kurkumin mampu menurunkan viabilitas sel berturut-turut sebesar 75 % dan 85 %. Dari analisa probit, harga IC_{50} dari GVT-0 dan kurkumin masing-masing sebesar 43,67 dan 29,14 μM. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa potensi sitotoksisitas dari GVT-0 lebih rendah dibandingkan kurkumin.



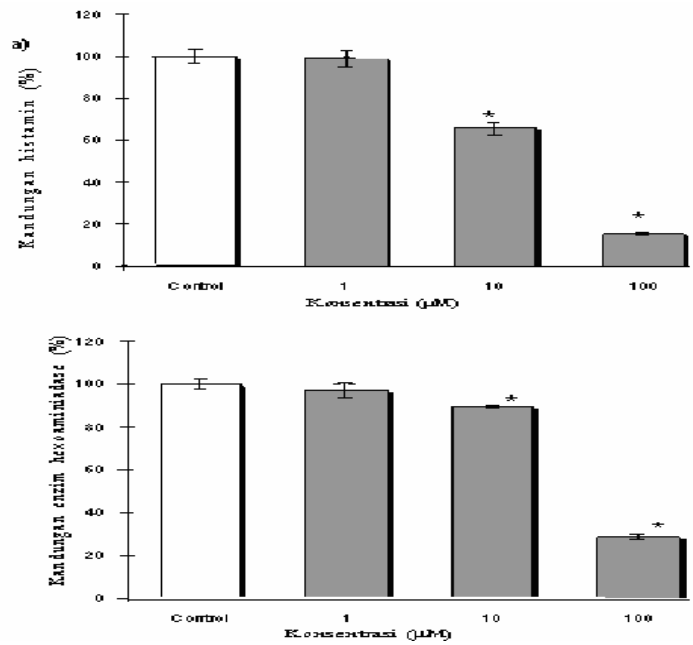
Gambar 2. Pengaruh GVT-0 dan kurkumin dengan range konsentrasi 0,1-100 μM terhadap viabilitas sel RBL-2H3. Sel diinkubasi selama 24 jam dengan berbagai variasi konsentrasi GVT-0 (■) atau kurkumin (□). Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata ± SEM. *Berbeda bermakna dibandingkan kontrol negatif ($p<0,05$).



Gambar 3. Gambaran morfologi kultur sel RBL-2H3 dalam medium PIPES setelah mendapatkan perlakuan GVT-0 dan kurkumin selama 24 jam. a) kontrol, b) GVT-0 1 μM, c) GVT-0 100 μM; d) kurkumin 100 μM.

Pada uji sitotoksisitas, selain dilakukan uji WST-1 untuk melihat viabilitas sel, terhadap sel juga dilakukan beberapa uji yaitu : 1) pengamatan morfologi kultur sel menggunakan mikroskop dan 2) kandungan histamin dan enzim β-hexoaminidase. Hasil pengamatan morfologi kultur sel RBL-2H3 setelah mendapatkan perlakuan GVT-0 maupun kurkumin (Gambar 3). Hasil pengamatan morfologi kultur sel dengan mikroskop adalah seiring dengan hasil uji WST-1. Pada perlakuan GVT-0 konsentrasi 1 μM nampak tidak mempengaruhi morfologi maupun densitas kultur sel RBL-2H3. Di lain pihak, perlakuan konsentrasi tertinggi yakni sebesar 100 μM mampu menurunkan densitas kultur sel maupun mempengaruhi morfologi sel (Gambar 3).

Sel RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia cells*) merupakan analog tumor dari sel mast yang mengandung suatu granul yang berisikan beberapa mediator penting yaitu histamin, proteoglikan, serin protease, enzim β-hexoaminidase. Pada penelitian ini, dipelajari pengaruh perlakuan GVT-0 pada kandungan histamin dan enzim β-hexoaminidase setelah 24 jam inkubasi pada kultur sel RBL-2H3 (Gambar 4). Perlakuan GVT-0 konsentrasi 1



Gambar 4. Pengaruh GVT-0 terhadap kandungan histamin **(a)** maupun enzim β-hexoaminidase **(b)** dari kultur sel RBL-2H3. Sel diinkubasi selama 24 jam dengan berbagai variasi konsentrasi GVT-0. Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata ± SEM. *Berbeda bermakna dibandingkan kontrol negatif ($p<0,05$).

μM belum berpengaruh secara bermakna terhadap kandungan histamin dan enzim β-hexoaminidase. Pada dosis 10 dan 100 μM, GVT-0 menurunkan kandungan histamin dalam kultur sel RBL-2H3 sebesar berturut-turut 34,27±2,84 % dan 84,63±0,80 %. Pada kedua dosis tersebut, GVT-0 juga secara bermakna ($P<0,05$) mampu menurukan kandungan enzim β-hexoaminidase dalam kultur sel RBL-2H3 sebesar berturut-turut 10,48±3,88 % dan 71,21±1,11 %.

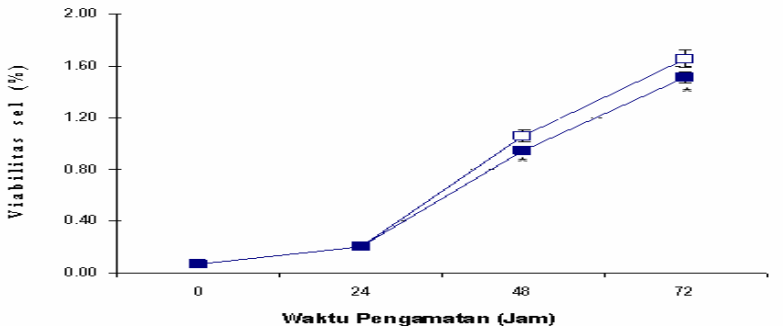
Uji antiproliferatif GVT-0 terhadap sel RBL-2H3

Evaluasi aktivitas antiproliferatif sel dilakukan dengan cara menguji kinetika proliferasi sel. Uji antiproliferasi dilakukan seperti pada uji sitotoksisitas namun hanya dilakukan menggunakan satu konsentrasi GVT-0 (1 μM), dan pengamatan dilakukan pada jam ke 0, 24, 48 dan 72. Penetapan konsentrasi GVT-0 1 μM memper-timbangkan bahwa konsentrasi tersebut dibawah harga IC_{50}-nya pada uji sitotoksisitas, sehingga sel tidak terlalu banyak yang mati pada pengamatan pada jam ke-48 dan 72 dan lebih lanjut agar kinetika proliferasi sel dapat teramati hingga jam ke-72. Hasil uji antiproliferatif GVT-0 konsentrasi 1 μM pada kultur sel RBL-2H3 (Gambar 5).

Dari Gambar 5, kurva absorbansi (WST-1) terhadap waktu pengamatan dari kelompok GVT-0 lebih rendah dibandingkan kurva dari kelompok kontrol (terutama pada jam ke-24 dan 72). Ini berarti bahwa perlakuan GVT-0 mampu mempengaruhi kinetika proliferasi sel RBL-2H3 secara bermakna ($P<0,05$) terutama pada jam ke- 24 dan 72. Dalam artian lainnya, GVT-0 mampu memperpanjang waktu penggandaan sel (*doubling time*).

Hasil penelitian

Senyawa GVT-0 merupakan salah satu analog benzilidin aseton dari kurkumin (Reksohadiprodjo *et al.,* 2004). Baik GVT-0 maupun kurkumin mempunyai gugus hidroksi dan gugus metoksi pada rantai aromatiknya, perbedaannnya bahwa senyawa tersebut mempunyai kerangka tengahnya. Pada penelitian ini baik GVT-0 maupun kurkumin mampu menunjukkan aktivitas sitotoksisitas.



Gambar 5. Pengaruh GVT-0 konsentrasi 1 μM terhadap kinetika proliferasi sel RBL-2H3. Pengamatan baik pada kontrol (□) maupun perlakuan GVT-0 (■) dilakukan pada jam ke- 0, 24, 48 dan 72. Data yang ditampilkan merupakan nilai rata-rata ± SEM. *Berbeda bermakna dibandingkan kontrol ($p<0,05$).

Namun, potensi sitotoksisitas GVT-0 (IC_{50} : 43,67 μM) lebih rendah dibandingkan dengan kurkumin (IC_{50} : 29,14 μM). Dalam senyawa kurkumin maka gugus β-diketon (kerangka tengah) dan ikatan rangkap dari senyawa kurkumin tersebut telah dibuktikan berperan pada aktivitas antikanker dan antimutageniknya. Modifikasi kerangka 1,7-difenil-1,6-heptadien-3,5-dion (pada kurkumin) menjadi kerangka yang lebih sederhana 1,5-difenil-1,4-pentadien-3-on (pada GVT-0) inilah yang kemungkinan besar mengakibatkan potensi GVT-0 lebih rendah dibandingkan kurkumin. Pada uji antipro-liferasi, GVT-0 menunjukkan aktivitas antiproliferatif pada sel RBL-2H3 setelah pengamatan pada jan ke-48 dan 72.

Mekanisme sitotoksisitas dan antipro-liferasi dari GVT-0 kemungkinan besar mirip dengan mekanisme kurkumin yang merupakan *lead compound* dari GVT-0. Kurkumin dilaporkan mampu menurunkan ekspresi protein yang ditranskripsi oleh NF-κB yaitu Bcl-2 dan Bcl-xL yang bersifat antiapoptosis, dan cyclin D1 sehingga dapat menghambat proliferasi sel kanker dan memacu terjadinya proses apoptosis (Bharti *et al.*, 2003). Seiring dengan itu, Goel *et al.,* (2008) melaporkan bahwa kurkumin mengakibatkan down-regulasi cyclin D1, cyclin E dan MDM2, dan up-regulasi p21, p27, and p53. Woo *et al.* (2003) melaporkan bahwa aktivitas sitotoksisitas kurkumin melibatkan induksi proses apoptosis pada sel kanker melalui mekanisme aktivasi caspase 3, perangsangan spesies oksigen reaktif, defosforilasi Akt, down-regulasi protein antiapoptosis Bcl-1, Bcl-xL dan IAP, dan pelepasan sitokrom c. Kurkumin juga dilaporkan sangat poten dalam menghambat enzim sikloksigenase-2 (COX-2) (Gafner *et al.*, 2004).

Peningkatan ekspresi COX-2 akan meningkatkan protein Bcl-2 kan akan menghambat proses apoptosis sel dan menuunkan *transforming growth factor* β2 dan E-chaderin yang mengakibatkan adhesi sel ke matriks ekstraseluler (Tsujii dan DuBois, 1995). Disamping itu, peningkatan protein COX-2 pada suatu sel dapat meningkatkan produksi faktor proangiogenesis yang embantu mening-katkan pasokan vaskuler yang diperlukan untuk mengirim nutrisi dan oksigen ke sel tumor (Tsujii *et al.*, 1998). Aktivitas penghambatan COX-2 tersebut memung-kinkan pengem-angan kurkumin sebagai senyawa antikanker yang bersifat antiproliferatif dan memacu proses apoptosis (Meiyanto, 1999).

Kesimpulan

Gamavuton-0 atau 1,5-*bis*(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-1,4-pentadien-3-on, yang meru-akan salah satu analog benzilidin aseton dari kurkumin menunjukkan aktivitas sitotoksisitas dan antiproliferatif pada sel leukemia basofilik tikus (RBL-2H3).

Daftar Pustaka

Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B., 2008, Curcumin and cancer: An "old-age" disease with an "age-old" solution, *Cancer Letters*, **267** : 133–164.

Bharti, A.C., Donato, N., Singh, S., and Aggarawal, B.B., 2003, Curcumin (diferlomethane) down-regulates the constitutive action of nuclear factor-κB and IκBα kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis, *Blood*, **101(3)**:1053-1062.

Gafner, S., Lee, SK., Cuendet, M., Barthelemy, S.,Vergnes, L., Labidalle, S., Mehta RG, Boone CW, and Pezzuto JM., 2004, Biologic evaluation of curcumin and structural derivatives in cancer chemoprevention model systems, *Phytochemistry*, **65** : 2849–2859.

Goel A, Kunnumakkara AB, and Aggarwal BB, 2008, Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic, *Biochem Pharmacol.*, **75(4)**:787-809.

Kuo, M.L., Huang, T.S, Lin, and J.K., 1996, Curcumin, an antioxidant and anti-tumor promoter, induces apoptosis in human leukemia cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1317** : 95-100

Masuda, T., Jitoe, A., Isobe, J., Nakatani, N., and Yonemori, S., 1993, Antioxidative and Anti-inflammatory Curcumin-Related Phenolics from Rhizomes of Curcuma domestica, *Phytochemistry*, **32(6)**: 1557-1560.

Meiyanto, E., 1999, Kurkumin sebagai Obat Anti Kanker : Menelusuri Mekanisme Aksinya, *Majalah Farmasi Indonesia*, **10(4)**:224-236.

Park, S.Y., dan Kim, D.S.H.L., 2002, Discovery of Natural Products from Curcuma longa that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease, *J. Nat. Prod.,* **65(9)**: 1227-1231.

Reksohadiprodjo MH, Timmerman H, Sardjiman, Supardjan AM., Sudibyo M., Sugiyanto, Hakim L., Nurlaila, Hakim AR, Puspitasari I, Purwantiningsih, Nurrochmad A, Oetari, and Yuwono T, 2004, Derivatives of Benzylidene Cyclohexanone, Benzylidene Cyclopentanone, and Benzylidene Acetone, and Therapeutics Use Thereof, *US Patent*, US 6,777,447 B2.

Shishodia, S., Sethi, G., and Aggarwal, B.B., 2005, Curcumin: Getting Back to the Roots, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1056**: 206–217.

Tonnesen, H.H., and Karlsen, J., 1985, Studies on curcumin and curcuminoid. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution, *Z Lebensm Unters Forsch*, **80(5)**:402-404.

Tsujii, M., and DuBois, R., 1995, Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2, *Cell*, **83**: 493–501.

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Saeaoka, H., Hori, M., and Dubois, R.N., 1998, Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, *Cell*, **93**, 705–716.

Woo, H.B., Shin, W.S., Lee, S., and Ahn, C.M., 2005, Synthesis of novel curcumin mimics with asymmetrical units and their anti-angiogenic activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15** : 3782–3786.

Woo, J.H., Kim, Y.H., Choi, Y.J., Kim, D.G., Lee, K.S., Bae, J.H., Min, D.S.,. Chang, J.S., Jeong, *Y.J.*, *Lee*, *Y.H.*, Park,. J.W. and Kwon, T.K., 2003, Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down-regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt, *Carcinogenesis*, **24(7)** :1199-1208.

Yamatodani, A., Fukuda, H., Wada, H., Iwaeda, T., and Watanabe, T., 1985, High-performance liquid chromatographic determination of plasma and brain histamine without previous purification of biological samples : cation-exchange chromatography coupled with post-column derivatization fluorometry, *J Chromatogr.*, **344** : 115-123.

* Korespondensi : Agung Endro Nugroho
Farmakologi dan Farmasi Klinik Fakultas Farmasi UGM
E-mail : agungendronugroho@yahoo.com