

## Pengaruh PGV-1 dan PGV-2 terhadap enzim $\beta$ -hexosaminidase pada sel mast akibat induksi ion kalsium intraseluler

### The effects of PGV-1 and PGV-2 on the $\beta$ -hexosaminidase release from intracellular calcium ion-induced mast cells

Agung Endro Nugroho<sup>1\*</sup>, Sardjiman<sup>1</sup> dan Kazutaka Maeyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

<sup>2</sup> Department of Pharmacology, Informational Biomedicine, School of Medicine, Ehime University Japan

#### Abstrak

PGV-1 atau 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin) siklopentanon; dan PGV-2 atau 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dietilbenzilidin) siklopentanon merupakan dua senyawa analog kurkumin (US patent 2004). Pada penelitian ini, kedua senyawa tersebut diuji pengaruhnya terhadap pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase dari kultur sel mast (RBL-2H3). Thapsigargin dan ionomycin digunakan sebagai perangsang ion kalsium intraseluler dalam merangsang pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase dari sel mast. Pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase diukur dengan metode kolorimetri, dan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 405 nm. Senyawa *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-deoksi- $\beta$ -D-glukopiranosida digunakan sebagai substrat enzim pada percobaan ini. Pada penelitian ini, pemberian thapsigargin 0,5  $\mu$ M atau ionomycin 1  $\mu$ M dapat merangsang pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase dari kultur sel RBL-2H3 berturut-turut sebesar 43,91  $\pm$  1,30 % dan 52,93  $\pm$  2,07 %. PGV-1 and PGV-2 mampu menghambat pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase dari kultur sel RBL-2H3 akibat kenaikan ion kalsium intraseluler. Efek penghambatan dari kedua senyawa tersebut adalah tergantung besarnya konsentrasi yang digunakan. PGV-1 and PGV-2 (100  $\mu$ M) menghambat pelepasan enzim  $\beta$ -hexoaminidase berturut-turut sebesar 73,51  $\pm$  8,69 % dan 66,42  $\pm$  8,63 % pada percobaan thapsigargin; dan sebesar 89,73  $\pm$  3,23 % dan 38,57  $\pm$  5,32 % pada percobaan ionomycin. Harga  $IC_{50}$ , yang merupakan parameter potensi dari kedua senyawa tersebut, berturut-turut sebesar 22,20  $\mu$ M dan 22,27  $\mu$ M pada percobaan thapsigargin; dan sebesar 22,77  $\mu$ M dan >100  $\mu$ M pada percobaan ionomycin. PGV-1 dan PGV-2 menunjukkan efek penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari sel mast dengan melibatkan penghambatan selama proses aktivasi ion kalsium intraseluler pada sel mast.

**Kata kunci** : kurkumin, PGV-1, PGV-2, sel mast, enzim  $\beta$ -hexoaminidase

#### Abstract

PGV-1 or 2,5-bis(4'-hydroxy-3',5'-dimethylbenzylidene)cyclopentanone and PGV-2 or 2,5-bis(4'-hydroxy-3',5'-diethylbenzylidene)cyclopentanone are two benzylidene cyclopentanone analogues of curcumin. In our study, we investigated the effects of these compounds on the  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release from mast cell culture (RBL-2H3 cell line). Thapsigargin and ionomycin were used as intracellular calcium ion stimulants for inducing  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release from mast cells. The release of  $\beta$ -hexoaminidase enzyme was determined by colorimetric methods with substrate, *p*-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranocide, and a microplate reader at 405 nm. In present study, treatment of 0.5  $\mu$ M thapsigargin or 1  $\mu$ M ionomycin could stimulate the release of  $\beta$ -hexoaminidase enzyme from RBL-2H3 cells by 43.91  $\pm$  1.30 % dan

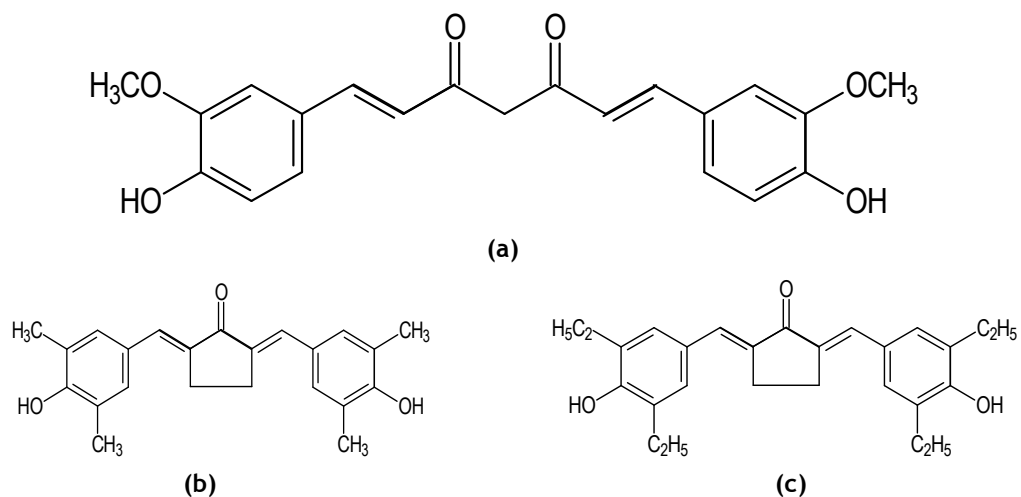
52.93 ± 2.07 %, respectively. PGV-1 and PGV-2 showed inhibitory effects on the  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release from RBL-2H3 cells induced by the increase of intracellular calcium ion in dose-dependent manner. At the dose of 100  $\mu$ M, PGV-1 and PGV-2, respectively, inhibited the  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release by 73.51 ± 8.69 % and 66.42 ± 8.63 % on thapsigargin experiments; and by 89.73 ± 3.23 % and 38.57 ± 5.32 % on ionomycin experiments. The IC<sub>50</sub> values of their effects on the  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release from RBL-2H3 cells, respectively, were 22.20  $\mu$ M and 22.27  $\mu$ M on thapsigargin experiment; and 22.77  $\mu$ M and >100  $\mu$ M on ionomycin experiment. Based on the results, the inhibitory effect of PGV-1 and PGV-2 on the  $\beta$ -hexoaminidase enzyme release from RBL-2H3 cells involving mechanisms related to the alteration on activation processes of intracellular calcium ion on mast cells.

**Key words :** Curcumin, PGV-1, PGV-2, mast cells,  $\beta$ -hexoaminidase enzyme

## Pendahuluan

Kurkumin merupakan senyawa berwarna kuning yang diekstraksi dari turmeric, suatu serbuk rimpang tanaman *Curcuma longa* Linn (Ireson *et al.*, 2002; Goel *et al.*, 2008). Kurkumin mempunyai aktivitas biologi antara lain antiinflamasi, antioksidan, antikanker, anti-hepatotoksik dan lainnya (Mukhopadhyaya *et al.*, 1982; Sharma, 1976; Mahady *et al.*, 2002; Weisberg *et al.*, 2008; Kamalakkannan *et al.*, 2005; Kuttan *et al.*, 1985). Kurkumin dilaporkan sebagai senyawa tidak toksik pada uji praklinik toksisitas akut pada tikus, marmut dan kera; maupun pada uji klinik pada sukarelawan manusia (Shankar *et al.*, 1980; Aggarwal *et al.*, 2003).

Upaya modifikasi struktur kimia kurkumin guna mendapatkan stabilitas yang lebih baik maupun aktivitas yang lebih poten telah dilakukan, salah satunya adalah dengan mengubah struktur tengah dari kurkumin menjadi siklopentanon menghasilkan benzilidin siklopentanon. Beberapa senyawa dari analog kurkumin tersebut dilaporkan mempunyai efek farmakologi yang poten (antioksidan, antiinflamasi, antibakteri) yaitu 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin) siklopentanon atau PGV-1; dan 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-diethylbenzilidin) siklopentanon atau PGV-2, seperti tersaji pada Gambar 1 (Reksohadiprodjo *et al.*, 2004).



Gambar 1. Struktur kimia dari kurkumin (a), PGV-1 (b) dan PGV-2 (c).

## Metodologi

### Bahan

Bahan uji utama yaitu 2,5-*bis*(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin) siklopentanon (PGV-1) dan 2,5-*bis*(4'-hidroksi 3',5'-dietilbenzilidin) siklopentanon (PGV-2) diperoleh dari Dr. Sardjiman, MS., Apt (Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta). Sebagai substrat bagi enzim  $\beta$ -hexosaminidase digunakan *p*-nitropheny 1-2-Acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucofuranoside (Wako Pure Chemical Co., Osaka Japan). Sebagai penginduksi ion kalsium intraseluler digunakan Ionomycin (Calbio-Chem) dan thapsigargin (Sigma, Chemical). Bahan lainnya adalah medium MEM and antibiotika (kombinasi natrium penisilin G dan streptomisin sulfat) (Grand Island, NY), fetal calf serum (JRH Biosciences), PIPES (Dosindo, Kumamoto Japan).

### Cara kerja.

#### Preparasi rat basophilic cell line (RBL-2H3).

Sel line RBL-2H3 (Department of Pharmacology, School of Medicine, Ehime University Japan) dikultur menggunakan medium MEM yang mengandung fetal calf serum dan antibiotika, diinkubasikan dalam inkubator suhu 37 °C dan CO<sub>2</sub> 5 %. Sel tersebut ditumbuhkan dalam *plate* 24 sumuran dengan kepadatan sel 5 x 10<sup>5</sup> tiap sumuran dengan volume medium 400  $\mu$ L tiap sumuran. Sel tersebut kemudian disensitisasi dengan Monoklonal IgE. Sel diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator suhu 37 °C dan CO<sub>2</sub> 5 %. Setelah itu, sel dicuci dua kali dengan larutan dapar PIPES 500  $\mu$ L, kemudian dipreinkubasi dengan PIPES (sebagai kontrol) atau larutan senyawa uji dalam PIPES (konsentrasi 1-100  $\mu$ M) sebanyak 180  $\mu$ L selama 10 menit pada suhu 37 °C. Kemudian, sel ditambahkan larutan penginduksi enzim  $\beta$ -hexosaminidase, DNP<sub>24</sub>-BSA 200 ng/mL, sebanyak 20  $\mu$ L tiap sumuran, dan kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. *Plate* disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm, dan supernatan sebanyak 50  $\mu$ L dipindah ke tube 1,5 mL. Supernatan ditambahkan asam perklorat 3 % sebanyak 250  $\mu$ L, dan di-mixer. Kemudian, ditambahkan larutan KOH 2M/ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 M sebanyak

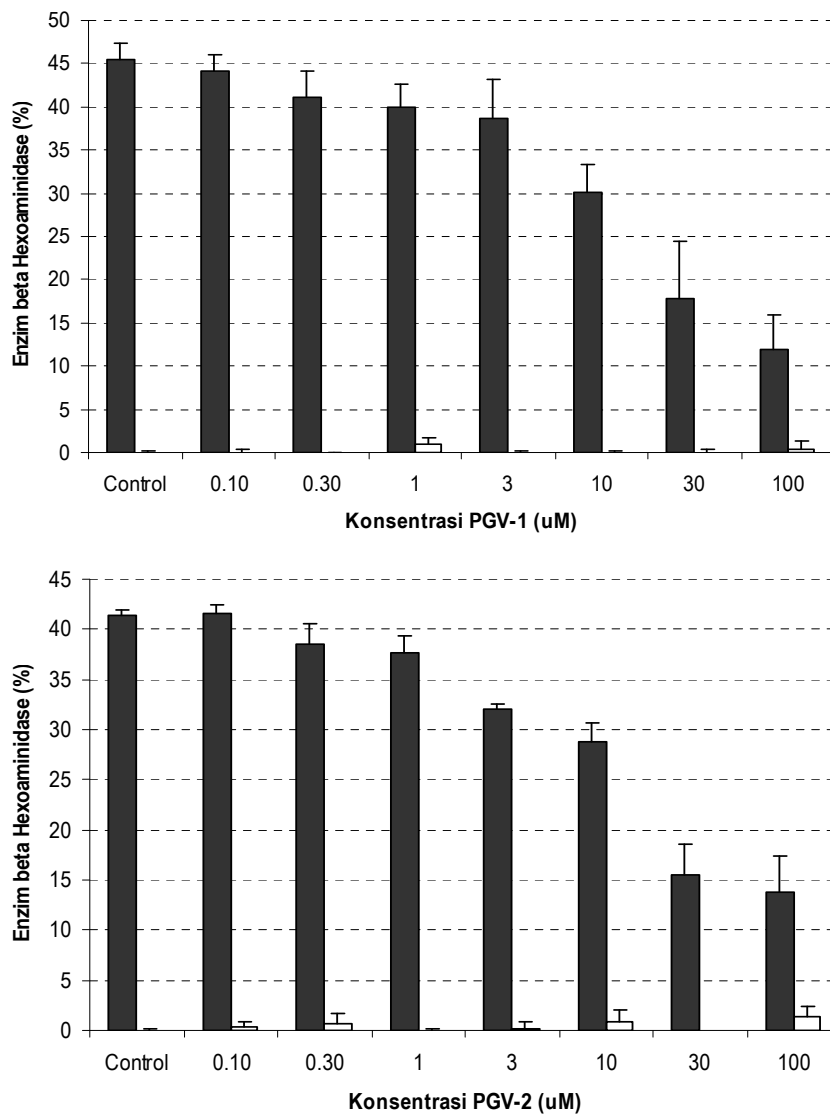
30  $\mu$ L, dicampur kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan siap ditetapkan absorbansi enzim  $\beta$ -hexoaminidasennya. Untuk penetapan total enzim  $\beta$ -hexosaminidase, sebanyak 350  $\mu$ L larutan dapar PIPES ditambahkan pada 6 sumuran, kemudian disonifikasi. Larutan homogenat sel siap dilakukan penetapan enzim  $\beta$ -hexosaminidase.

### Penetapan enzim $\beta$ -hexosaminidase

Pada penetapan enzim  $\beta$ -hexosaminidase, supernatan sebanyak 50  $\mu$ L diinkubasi dengan 2,5 mM *p*-nitrofenil-2-acetamido-2-deoksi-  $\beta$ -D-glukopiranosida 100  $\mu$ L (dalam 50 mM larutan dapar natrium sitrat pH 4,5) selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, sebanyak 20  $\mu$ L 2M KOH/ 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ditambahkan pada campuran larutan tersebut, kemudian aktivitas enzim  $\beta$ -hexosaminidase ditetapkan menggunakan analisis kolorimetri dengan microplate reader (Shimadzu) pada panjang gelombang 405 nm.

### Analisis data.

Data penelitian berupa absorbansi pada panjang gelombang 405 nm kemudian diubah menjadi prosentase pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dengan rumus : selisih antara absorbansi enzim pada kelompok sel tersensitisasi antigen dengan kelompok sel yang tidak tersensitisasi antigen (kontrol), kemudian dibagi oleh selisih antara absorbansi total enzim  $\beta$ -dengan absorbansi kelompok kontrol, hasilnya dikalikan seratus. Nilai IC<sub>50</sub> (konsentrasi yang digunakan untuk menimbulkan efek sebesar 50 %) digunakan sebagai parameter potensi dari efek penghambatan kedua senyawa tersebut terhadap enzim  $\beta$ -hexosaminidase. Potensi menunjukkan suatu besaran konsentrasi atau dosis, harganya berkebalikan dengan konsentrasi senyawa. Semakin kecil konsentrasi yang digunakan untuk mencapai efek maksimum maka semakin besar potensinya. Semua data disajikan dalam bentuk mean  $\pm$  SEM. Analisa statistika menggunakan *one-way analysis of variance* (ANOVA), dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference* (LSD). Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95 %.



Gambar 2. Histogram pengaruh PGV-1 dan PGV-2 terhadap pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi thapsigargin 0,5  $\mu$ M. \*  $P < 0.05$  berbeda bermakna dbandingkan kontrol.  $\square$  = tanpa thapsigargin,  $\blacksquare$  = dengan thapsigargin (n=4-6).

### Hasil dan Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari efek penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase oleh dua senyawa analog kurkumin yaitu : 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dimetilbenzilidin) siklopentanon (PGV-1) dan 2,5-bis(4'-hidroksi-3',5'-dietilbenzilidin)

siklopentanon (PGV-2) pada kultur sel mast (RBL-2H3) akibat kenaikan ion kalsium intraseluler. Kultur sel RBL-2H3 (*rat basophilic leukemia*) merupakan kultur sel leukimia basofil tikus, lazim digunakan dalam penelitian antialergi *in vitro* sebagai analog tumor selmast (Siraganian *et al.*, 1982).

Tabel I. Persentase penghambatan pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi thapsigargin, beserta nilai  $IC_{50}$ -nya

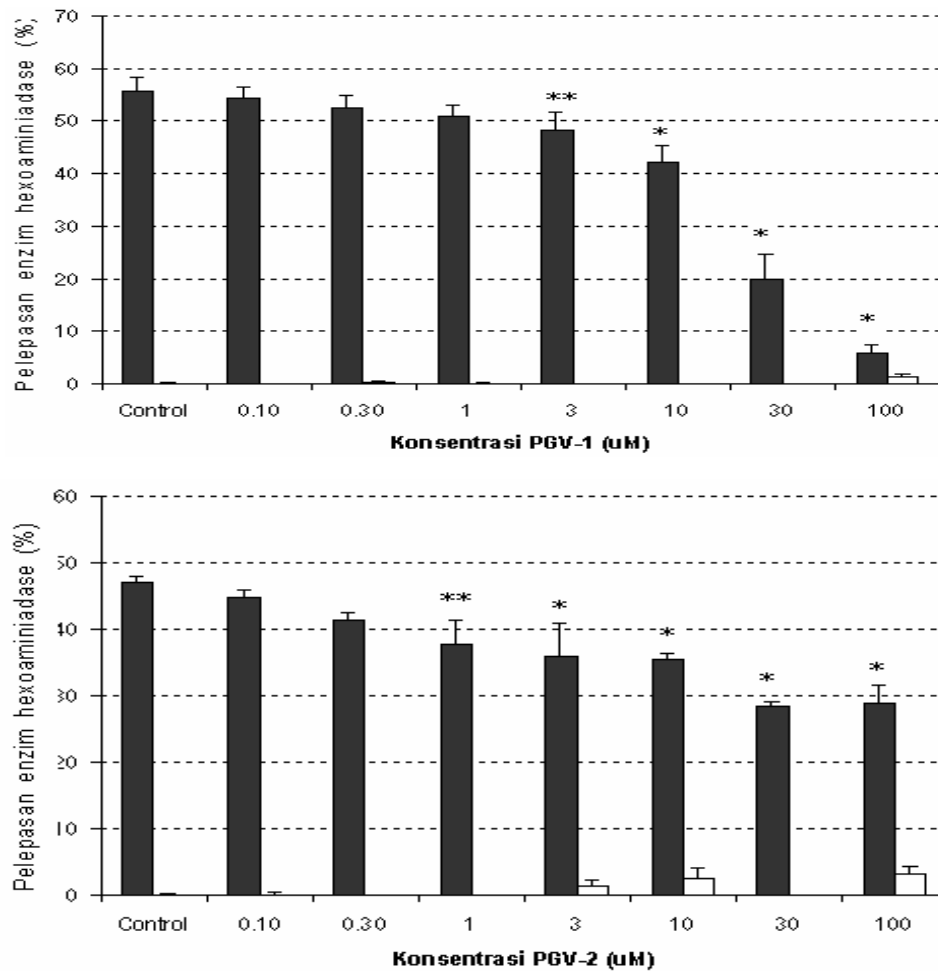
Konsentrasi ( $\mu$ M)	Persentase penghambatan pelepasan enzim $\beta$ -hexosaminidase	
	PGV-1	PGV-2
0,1	2,88 $\pm$ 4,43	-0,64 $\pm$ 2,09
0,3	9,51 $\pm$ 6,76	6,70 $\pm$ 4,75
1	11,73 $\pm$ 5,68	9,10 $\pm$ 4,43
3	14,71 $\pm$ 9,99	22,56 $\pm$ 1,35
10	33,52 $\pm$ 7,01	30,21 $\pm$ 4,58
30	60,56 $\pm$ 14,47	62,48 $\pm$ 7,23
100	73,51 $\pm$ 8,69	66,42 $\pm$ 8,63
$IC_{50}$	22,20	22,27

Tabel II. Persentase penghambatan pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi ionomycin, beserta nilai  $IC_{50}$ -nya

Konsentrasi ( $\mu$ M)	Persentase penghambatan pelepasan enzim $\beta$ -hexosaminidase	
	PGV-1	PGV-2
0,1	2,74 $\pm$ 4,14	5,16 $\pm$ 2,40
0,3	5,99 $\pm$ 4,49	12,50 $\pm$ 2,56
1	8,87 $\pm$ 3,82	20,12 $\pm$ 7,80
3	13,32 $\pm$ 6,04	23,79 $\pm$ 10,62
10	24,30 $\pm$ 5,53	24,91 $\pm$ 1,97
30	64,55 $\pm$ 8,59	40,00 $\pm$ 1,67
100	89,73 $\pm$ 3,23	38,57 $\pm$ 5,32
$IC_{50}$	22,77	> 100

Thapsigargin merupakan senyawa sesquiterpen laktone yang diisolasi dari tanaman *Thapsia garganica*. Senyawa ini menginduksi pelepasan mediator sel mast melalui peningkatan ion kalsium intraseluler (Patkar *et al.*, 1979; Brayden *et al.*, 1989). Pada percobaan kali ini, pemberian thapsigargin 0,5  $\mu$ M mampu menginduksi pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 sebesar 43,91  $\pm$  1,30 % (n=10). Pada penelitian sebelumnya, pemberian PGV-1 atau PGV-2 selama 30 menit tanpa perlakuan penginduksi histamin, tidak mempengaruhi viabilitas maupun kandungan histamin dari kultur sel RBL-2H3 (Nugroho *et al.*, 2007).

Di lain pihak, pemberian kedua senyawa tersebut mampu menghambat pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi oleh thapsigargin selama 30 menit (Gambar 2). Dalam hal tersebut, semakin tinggi konsentrasi PGV-1 atau PGV-2, semakin besar pula efek penghambatannya (*dose-dependent manner*). Pemberian PGV-1 dan PGV-2 mulai menghambat enzim  $\beta$ -hexosaminidase secara bermakna ( $P < 0,05$ ) berturut-turut pada dosis 10  $\mu$ M dan 3  $\mu$ M, dengan nilai penghambatan berturut-turut sebesar 33,52  $\pm$  7,00 % dan 22,56  $\pm$  1,35 %.



Gambar 3. Histogram pengaruh PGV-1 dan PGV-2 terhadap pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi ionomycin 1  $\mu$ M. \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,1$  berbeda bermakna dibandingkan kontrol. □ = tanpa ionomycin, ■ = dengan ionomycin (n=3-6).

Pada dosis tertinggi percobaan (100  $\mu$ M), PGV-1 dan PGV-2 menghambat pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari sel mast sebesar berturut-turut 73,51  $\pm$  8,69 % dan 66,42  $\pm$  8,63 %.

Nilai  $IC_{50}$  penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase (diinduksi thapsigargin) oleh PGV-1 dan PGV-2 berturut-turut adalah sebesar 22,20  $\mu$ M dan 22,27  $\mu$ M (Tabel I), atau dapat dikatakan

Potensi penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase (diinduksi thapsigargin) oleh kedua senyawa tersebut adalah sama.

Pada Gambar 3, PGV-1 dan PGV-2 diuji pengaruhnya terhadap pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari sel mast yang diinduksi oleh ionomycin. Ionomycin merupakan  $Ca^{2+}$  ionophore yang dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium pada sel mast (Huang and Putney, 1998).

Ionophore merupakan suatu senyawa yang larut pada lipid yang berfungsi untuk membantu transport ion-ion melintasi 2 lapisan lipid pada membran sel (Albert *et al.*, 1994). Pemberian ionomycin 1  $\mu\text{M}$  pada kultur sel RBL-2H3 dapat merangsang pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase sebesar  $52,93 \pm 2,07$  % ( $n=9$ ). Pemberian PGV-1 atau PGV-2 dapat menghambat pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel RBL-2H3 yang diinduksi oleh ionomycin (Gambar 3). Semakin tinggi konsentrasi PGV-1 atau PGV-2 yang digunakan, semakin besar pula efek penghambatannya (*dose-dependent manner*).

PGV-1 dan PGV-2 mulai menunjukkan efek penghambatan terhadap enzim  $\beta$ -hexosaminidase secara bermakna ( $P < 0,1$ ) berturut-turut pada dosis 3  $\mu\text{M}$  dan 1  $\mu\text{M}$ , dengan nilai penghambatan berturut-turut sebesar  $13,32 \pm 6,04$  % dan  $20,12 \pm 7,80$  %. Pada dosis 100  $\mu\text{M}$ , PGV-1 dan PGV-2 menghambat enzim tersebut sebesar berturut-turut  $89,73 \pm 3,23$  % dan  $38,56 \pm 5,32$  %. Pada penelitian ini, nilai  $\text{IC}_{50}$  penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase (diinduksi ionomycin) oleh PGV-1 dan PGV-2 berturut-turut adalah sebesar 22,77  $\mu\text{M}$  dan  $> 100$   $\mu\text{M}$  (Tabel II). Berdasarkan hasil tersebut, potensi PGV-1 dalam menghambat enzim  $\beta$ -hexosaminidase yang diinduksi ionomycin lebih besar dibandingkan potensi dari PGV-2. Pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase tanpa sensitisasi imunologis juga diamati pada percobaan ini. Fenomena tersebut dinamakan sebagai pelepasan enzim secara spontan.

Mengacu pada tulisan Ikawati *et al.* (2001) yang menggunakan histamin sebagai paramater mediator sel mast. Efek induksi spontan akan dipertimbangkan bermakna jika melebihi nilai 10 %. Pemberian PGV-1 dan PGV-2 dengan konsentrasi 0,1 hingga 100  $\mu\text{M}$  tidak menunjukkan efek pelepasan enzim secara spontan secara bermakna

pada sel kultur RBL-2H3. PGV-1 dan PGV-2 merangsang pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase secara maksimum berurutan sebesar  $1,29 \pm 0,60$  % dan  $3,18 \pm 1,12$  % (Gambar 2-3).

### Diskusi hasil penelitian

Enzim  $\beta$ -hexosaminidase merupakan suatu enzim lisosomal, dikenal juga dengan nama  $\beta$ -*N*-asetilhexosaminidase (Hex, EC 3.2.1.52). Terdapat dua isoenzim yaitu hex A, tersusun oleh subunit  $\alpha$  dan  $\beta$ ; dan hex B, tersusun hanya oleh subunit  $\beta$ . (Casal *et al.*, 2005; Mahuran 1995). Defisiensi dari enzim  $\beta$ -hexosaminidase terutama hex A, akan mengakibatkan akumulasi ganglioside  $\text{GM}_2$  dalam beberapa jaringan, lebih lanjut bisa menimbulkan penyakit lisosomal ( $\text{GM}_2$  gangliosidosis) misalnya penyakit Tay-Sachs (TSD) dan penyakit Sandhoff (Marinkovic dan Marinkovic, 1977). Sel mast akan mensekresikan enzim-enzim tersebut apabila mendapatkan pacuan baik imunologis maupun non-immunologis. Oleh karena itu, pada penyakit alergi inflamasi kadar enzim tersebut adalah tinggi (Schwartz *et al.*, 1979; Mahuran 1995).

Fenomena pergerakan ion kalsium menuju ke dalam sel mast (influks ion kalsium) yang teraktivasi karena pelepasan ion kalsium dari retikulum endoplasmik (*CRAC current*) merupakan proses yang mendasari terjadinya eksositosis granul sel mast guna melepaskan mediator sel mast. Ion kalsium yang berasal dari retikulum endoplasmik sangat terbatas dan tidak cukup untuk mengaktivasi sel. Oleh karena itu, pengosongan ion kalsium pada retikulum endoplasmik akan merangsang influks ion kalsium menuju ke dalam sel untuk keperluan aktivasi sel. Retikulum endoplasmik merupakan *intracelluller pool* dari ion kalsium yang mempunyai peran utama dalam aktivasi influks ion kalsium oleh kanal membran plasma sel, yang dikenal dengan nama *store-operated calcium channels* (*SOC channels*). Aktivasi kanal

tersebut kemudian merangsang *CRAC current*, yang selektif bagi ion kalsium. Ada beberapa hipotesis untuk menerangkan proses aktivasi *store-operated calcium influx*. Hipotesis pertama adalah model pembawa pesan kedua (*second messenger*) yang bersifat difusible, yang memperantarai transduksi sinyal dari proses pengosongan ion kalsium pada retikulum endoplasmik menuju proses aktivasi kanal *CRAC*. Hipotesis kedua (*conformational coupling hypothesis*) merupakan model eksositosis. Signal pengosongan ion kalsium pada retikulum endoplasmik kemudian disampaikan oleh reseptor inositol trifosfat ( $IP_3$ ) menuju membran sel. Kanal SOC berfusi dengan plasma membran melalui proses eksositosis (Alonso *et al.*, 2008; Scharenberg *et al.*, 2007).

$IP_3$  diproduksi melalui hidrolisis fosfatidil inositol bifosfat lipid membran sel ( $PIP_2$ ). Proses tersebut juga menghasilkan pembawa pesan kedua diasil gliserol (DAG), yang kemudian merangsang aktivasi dari protein kinase C. Proses hidrolisis  $PIP_2$  diperantarai oleh enzim fosfolipase C (PLC). Aktivasi pada protein G akan mengaktifasi isoenzim  $PLC\beta$ , sedangkan aktivasi reseptor terhubung dengan tirosin kinase (*tyrosine-kinase linked receptors*) misalnya aktivasi  $Fc\epsilon RI$  pada sel mast secara imunologis akan mengaktifasi isoenzim  $PLC\gamma$ . Dalam hal ini, compound 48/80 dapat secara langsung mengaktifasi protein G pada sel mast (Metcalf *et al.*, 1997; Scharenberg *et al.*, 2007).

Dalam homeostatis ion kalsium intraseluler, aktivitas kanal SOC diatur oleh 1) *STIM-1 (store  $Ca^{2+}$  sensor)* dan 2) *Orai-1 (CRACM-1)*. *STIM-1* merupakan protein transmembran dari retikulum endoplasmik berbobot molekul 77 kDa. *STIM-1* memegang peran krusial sebagai sensor ion kalsium, yang menghubungkan proses pengosongan ion kalsium pada retikulum endoplasmik dengan influks ion kalsium melalui kanal SOC. Di lain pihak,

*CRACM-1* merupakan kanal ion kalsium pada membran sel, yang akan teraktivasi akibat pelepasan ion kalsium dari retikulum endoplasmik. *CRACM-1* merupakan komponen molekular penting bagi kanal SOC pada membran sel. Selain itu, terdapat juga kanal *SERCA (sarco/endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}ATPase$ )* yang berfungsi sebagai pompa ion kalsium dari sitosol menuju ke retikulum endoplasmik. Proses ini bertujuan untuk mencegah pengosongan ion kalsium pada retikulum endoplasmik (Alonso *et al.*, 2008; Scharenberg *et al.*, 2007).

Thapsigargin merupakan senyawa turunan sesquiterpen lakton yang dapat merangsang pelepasan mediator sel mast. Target dari senyawa tersebut pada sel mast adalah pompa ATP-dependent  $Ca^{2+}$  (*SERCA*) dari retikulum endoplasmik guna mencegah pengisian kembali ion kalsium menuju retikulum endoplasmik tersebut. Hal ini mengakibatkan terjadinya peningkatan ion kalsium di sitoplasma yang kemudian memacu influks ion kalsium menuju ke dalam sel. Lebih lanjut, kenaikan ion kalsium intraseluler akibat proses tersebut akan memicu proses eksositosis granul dan akhirnya terjadi pelepasan mediator sel mast (Patkar *et al.*, 1979; Brayden *et al.*, 1989). Di lain pihak, Ionomycin merupakan antibiotik polieteter yang mempunyai afinitas tinggi terhadap aktivitas ion kalsium. Senyawa tersebut diperoleh dari proses fermentasi kultur bakteri *Streptomyces conglobatus* (Liu *et al.*, 1978; Westley *et al.*, 1979). Ionomycin merupakan  *$Ca^{2+}$  ionophore* yang dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium pada sel mast (Huang and Putney, 1998). Ionophore merupakan suatu senyawa yang larut pada lipid yang berfungsi untuk membantu transport ion-ion melintasi 2 lapisan lipid pada membran sel (Albert *et al.*, 1994).

Pada penelitian baik PGV-1 dan PGV-2 mampu menghambat pelepasan



enzim  $\beta$ -hexosaminidase dari kultur sel basofil tikus (RBL-2H3) yang diaktivasi oleh thapsigargin. Potensi kedua senyawa tersebut adalah sama dalam menghambat enzim tersebut. PGV-1 menunjukkan efek penghambatan yang besar terhadap pelepasan enzim  $\beta$ -hexosaminidase yang diaktivasi oleh ionomycin. Bahkan pada dosis teringgi percobaan, PGV-1 mampu memberikan efek penghambatan sebesar 90 %. Potensi efek PGV-1 lebih besar dibandingkan PGV-2 pada percobaan ionomycin. Dari hasil tersebut, efek penghambatan enzim  $\beta$ -hexosaminidase oleh kedua senyawa tersebut kemungkinan besar

melibatkan penghambatan pada proses aktivasi ion kalsium pada sel mast oleh thapsigargin ataupun ionomycin.

### Kesimpulan

PGV-1 dan PGV-2, senyawa analog benzilidin siklopentanon kurkumin, mampu menunjukkan efek penghambatan terhadap pelepasan mediator sel mast yaitu enzim  $\beta$ -hexosaminidase yang diinduksi oleh thapsigargin maupun ionomycin. Mekanisme penghambatan tersebut kemungkinan besar melibatkan penghambatan selama proses aktivasi ion kalsium intraseluler pada sel mast.

### Daftar Pustaka

- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., and Watson, J. D., 1994, *Molecular Biology of The Cell*, 3<sup>rd</sup> Edition, Garland Publishing Inc., New York.
- Alonso, E., Alfonso, A., Lober, K., and Botana L. M., 2008, The effect of rottlerin in calcium regulation in HMC-1(560) cells is mediated by a PKC-delta independent effect, *J. Cell Biochem.*, 105(1), 255-261.
- Aggarwal, B. B., Kumar, A., and Bharti, A. C., 2003, Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res.*, 23(1A):363-398.
- Brayden, D. J., Hanley M. R., Thastrup, O., and Cuthbert, A. W., 1989, Thapsigargin, a new calcium-dependent epithelial anion secretagogue, *Br J Pharmacol.*, 98(3):809-816.
- Casal, J. A., Cano, E., and Tutor, J. C., 2005,  $\beta$ -hexosaminidase isoenzyme profiles in serum, plasma, platelets and mononuclear, polymorphonuclear and unfractionated total leukocytes, *Clin. Biochem.*, 38(10): 938-942.
- Goel, A., Kunnumakkara, A. B., and Aggarwal, B. B., 2008, Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic, *Biochem Pharmacol.*, 75(4):787-809.
- Huang, Y. and Putney, J. W. Jr., 1998, Relationship between intracellular calcium store depletion and calcium release-activated calcium current in a mast cell line (RBL-1), *J. Biol Chem.*, 273(31):19554-19559.
- Ikawati, Wahyuono, S., and Maeyama K., 2001, Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells, *J. Ethnopharmacol.*, 75(2-3), 249-256.
- Ireson, C. R., Jones. D. J, Orr, S., Coughtrie, M. W., Boocock, D. J., Williams, M. L., Farmer, P. B., Steward, W. P., and Gescher, A. J., 2002, Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 11(1):105-111.
- Kamalakkannan, N., Rukkumani, R., Varma, P. S., Viswanathan, P., Rajasekharan, K. N., and Menon, V. P., 2005, Comparative effects of curcumin and an analogue of curcumin in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats, *Basic Clin. Pharmacol Toxicol.*, 97(1):15-21.

- Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K., and George, M. C., 1985, Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*), *Cancer Lett.*, 29(2):197-202.
- Liu, W. C., Slusarchyk, D. S., Astle, G., Trejo, W. H., Brown, W. E., and Meyers, E., 1978, Ionomycin, a new polyether antibiotic, *J. Antibiot (Tokyo)*, 31(9):815-819.
- Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., and Lu, Z. Z., 2002, Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen, *Anticancer Res.*, 22(6C):4179-4181.
- Mahuran, D. J., 1995,  $\beta$ -hexosaminidase: biosynthesis and processing of the normal enzyme, and identification of mutations causing Jewish Tay-Sachs disease, *Clin. Biochem.*, 28(2), 101-106.
- Marinkovic, D. V., and Marinkovic, J. N., 1977, Purification of Two Hexosaminidases from Human Kidney, *Biochem. J.*, 163: 133-140.
- Metcalf, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A., 1997, Mast cells, *Physiol Rev.*, 77, 1033-1064.
- Mukhopadhyay, A., Basu, N., Ghatak, N., and Gujral, P. K., 1982, Anti-inflammatory and irritant activities of curcumin analogues in rats, *Agents Actions*, 12(4):508-515.
- Nugroho, A. E., Sardjiman and Maeyama, K., 2007, Effects Of Benzylidene cyclopentanone Analogues on The Viability and Proliferation of RBL 2H3 Cells, Proceedings, 80th Annual Meeting of The Japanese Pharmacological Society, Nagoya.
- Patkar, S. A., Rasmussen, U., and Diamant, B., 1979, On the mechanism of histamine release induced by thapsigargin from *Thapsia garganica* L. , *Agents Actions.*, 9(1):53-57.
- Reksohadiprodjo, M. H., Timmerman, H., Sardjiman., Supardjan, A. M., Sudibyo, M., Sugiyanto, Hakim, L., Nurlaila., Hakim, A. R., 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.
- Scharenberg, A. M, Humphries, L. A., and Rawlings, D. J., 2007, Calcium signalling and cell-fate choice in B cells, *Nat Rev Immunol.*, 7(10):778-789.
- Shankar, T. N., Shantha, N. V., Ramesh, H. P., Murthy, I. A., and Murthy, V. S., 1980, Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guinea pigs and monkeys, *Indian. J. Exp Biol.*, 18(1):73-75.
- Sharma, O. P., 1976, Antioxidant activity of curcumin and related compounds, *Biochem Pharmacol.*, 25(15):1811-1812.
- Siraganian, R. P., McGivney A., Barsumian, E. L., Crews, F. T., Hirata, F., and Axelrod, J., 1982, Variants of the rat basophilic leukemia cell line for the study of histamine release, *Fed Proc.*, 41(1):30-34.
- Schwartz LB, Austen KF and Wasserman SI., 1979, Immunologic release of  $\beta$ -hexosaminidase and beta-glucuronidase from purified rat serosal mast cells, *J. Immunol.*, 123(4):1445-1450.
- Weisberg, S. P., Leibel, R and Tortoriello, D. V., 2008, Dietary curcumin significantly improves obesity-associated inflammation and diabetes in mouse models of diabetes, *Endocrinology*, 149(7):3549-3558.
- Westley, J. W., Liu, C. M., Evans R. H, and Blount J. F., 1979, Conglobatin, a novel macrolide dilactone from *Streptomyces conglobatus* ATCC 31005, *J. Antibiot (Tokyo)*, 32(9):874-877.

---

\* Koresponden: Agung Endro Nugroho, M.Si., PhD., Apt  
Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta  
Email : agungendronugroho@yahoo.com