

INTISARI

Tingginya insidensi kanker payudara serta munculnya resistensi terhadap kemoterapi konvensional menjadi tantangan utama dalam penanganannya. Kondisi ini mendorong pengembangan agen antikanker baru yang lebih efektif dan selektif. Pentagamavunon-1 (PGV-1), turunan sintetik dari kurkumin, menunjukkan potensi aktivitas antikanker melalui mekanisme spesifik, seperti penghentian siklus sel di fase G2/M, induksi mitotic catastrophe, peningkatan stres oksidatif, dan pemicu apoptosis. Berbeda dengan banyak agen kemoterapi konvensional, PGV-1 menunjukkan selektivitas tinggi terhadap sel kanker dibandingkan sel normal, sehingga berpotensi mengurangi efek samping sistemik yang umumnya terjadi pada terapi standar seperti doksorubisin, tamoxifen, atau cisplatin. Meskipun efektivitas monoterapi PGV-1 secara *in vitro* dan pre-klinik masih lebih rendah dibandingkan standar terapi yang ada, profil mekanisme aksi yang spesifik dan selektivitasnya yang baik menjadikan PGV-1 kandidat yang layak untuk terus dikembangkan sebagai agen kemoterapi baru. Upaya kombinasi PGV-1 dengan senyawa alami lain seperti piperin, diosmin, dan galangin telah dilakukan, namun hasilnya tidak optimal, karena efek antiproliferatif dan apoptosis yang dihasilkan terbatas dan memerlukan dosis tinggi. Untuk meningkatkan efektivitas terapi, kurkumin, senyawa alami yang dikenal memiliki aktivitas antikanker dipilih untuk dikombinasikan dengan PGV-1. Pemilihan kurkumin didasarkan pada kesamaan berbagai mekanisme aksi dan target molekuler dengan PGV-1 yang dapat melengkapi mekanisme kerja PGV-1, seperti jalur spesies oksigen reaktif (ROS), regulasi siklus sel, dan induksi apoptosis, sehingga kombinasi keduanya berpotensi menghasilkan efek sinergis sebagai strategi peningkatan efektivitas terapi. Selain itu, secara tunggal, kurkumin menunjukkan efektivitas yang lebih tinggi dibandingkan senyawa alami lain yang sebelumnya pernah dikombinasikan dengan PGV-1. Profil ini menawarkan keunggulan dalam hal efikasi, selektivitas, dan ketersediaan. Karena kombinasi sebelumnya belum menghasilkan efek yang optimal, kurkumin dipilih sebagai kandidat baru yang lebih potensial untuk dikombinasikan dengan PGV-1. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kombinasi PGV-1 dan kurkumin sebagai kandidat agen kemoterapi pada kanker payudara *triple-negative* dan luminal, dengan menilai efek antiproliferatif, induksi apoptosis, dan potensi antimetastasis melalui berbagai parameter pada model 2D dan 3D, untuk mengkaji efektivitas dan selektivitas terapinya.

Penelitian ini menggunakan dua pendekatan eksperimen, yaitu kultur sel monolayer 2D dan model spheroid 3D, untuk mengevaluasi efek kombinasi PGV-1 dan kurkumin pada sel kanker payudara. Sebagai dasar eksplorasi, kultur sel monolayer 2D digunakan untuk mengkaji respons awal sel kanker terhadap kombinasi PGV-1 dan kurkumin, sementara model kultur 3D spheroid diperlukan untuk mengevaluasi efektivitas kombinasi ini dalam lingkungan yang lebih kompleks dan menyerupai kondisi fisiologis tumor *in vivo*, diharapkan keduanya saling melengkapi dalam memberikan gambaran menyeluruh terhadap potensi terapinya. Uji sitotoksitas dengan metode MTT digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀ senyawa dan kombinasi. Analisis siklus sel dilakukan menggunakan pewarnaan propidium iodida, sementara apoptosis dievaluasi dengan pewarnaan

annexin V/PI, dan stres oksidatif diukur dengan pewarnaan DCFDA untuk mengidentifikasi ROS intraseluler melalui deteksi berbasis *flow cytometry*. Insiden *mitotic catastrophe* dianalisis dengan pewarnaan *May-Grünwald-Giemsa*, dan penuaan seluler (*senescence*) dideteksi dengan pewarnaan *SA-β-gal*. Aktivitas antimigrasi sel dinilai dengan uji *wound healing*, serta ekspresi MMP-2 dan MMP-9 dianalisis melalui *gelatin zymography*. Setelah memperoleh data awal dari kultur 2D, penelitian dilanjutkan dengan model spheroid 3D untuk mengevaluasi efek terapi dalam kondisi yang lebih mendekati sifat tumor asli. Model spheroid 3D dibentuk menggunakan kultur berbasis agarosa pada lempeng dasar datar, dan evaluasi meliputi pengukuran ukuran spheroid, ekspresi Ki-67 untuk proliferasi sel, *cleaved* caspase-3 untuk apoptosis, serta *SA-β-gal* untuk penuaan seluler. Pemeriksaan imunohistokimia untuk *cleaved* caspase-3 dan Ki-67 hanya dilakukan pada model spheroid 3D, memungkinkan analisis yang lebih mendalam mengenai respons sel kanker dalam konteks tumor tiga dimensi.

Hasil menunjukkan bahwa PGV-1 memiliki efek sitotoksik tunggal dengan IC_{50} sebesar 4 μ M pada sel 4T1 dan 2 μ M pada sel T47D. Sementara itu, kurkumin menunjukkan IC_{50} sebesar 40 μ M pada sel 4T1 dan 20 μ M pada sel T47D. Dibandingkan dengan sel normal Vero dan NIH-3T3, indeks selektivitas PGV-1 dan kurkumin pada kedua sel kanker tersebut lebih dari 3, hal ini menunjukkan bahwa kedua senyawa memiliki selektivitas yang baik terhadap sel kanker. Efek sitotoksik kombinasi PGV-1 dan kurkumin memiliki efek sinergis (indeks kombinasi $<0,7$) dalam menurunkan viabilitas sel 4T1 dan T47D. Pada model 2D, kombinasi menyebabkan peningkatan penghentian siklus sel di fase G2/M dan sub-G1, dengan akumulasi sel sub-G1 hingga 80% pada 4T1 dan 75% pada T47D. Apoptosis total meningkat hingga 85% pada 4T1 dan 80% pada T47D. Kombinasi juga meningkatkan kadar ROS sebesar 1,5 kali lipat dibandingkan kontrol dan menginduksi penuaan sel hingga 60% pada 4T1 dan 50% pada T47D, tanpa mempengaruhi viabilitas sel normal Vero dan NIH-3T3. Selain itu, kombinasi ini menekan migrasi sel kanker hingga 70% pada 4T1 dan 60% pada T47D, serta menurunkan ekspresi MMP-2 dan MMP-9. Pada model spheroid 3D, kombinasi secara signifikan menghambat pertumbuhan spheroid, dengan reduksi volume sebesar 70% pada 4T1 dan 65% pada T47D, disertai penurunan ekspresi Ki-67 dan peningkatan ekspresi *cleaved* caspase-3. Temuan ini mendukung potensi kombinasi PGV-1 dan kurkumin sebagai strategi terapi kanker payudara subtipe *triple-negative* (TNBC), yang berisiko tinggi bermetastasis, serta subtipe luminal, yang memiliki angka kejadian tertinggi.

Kesimpulannya, kombinasi PGV-1 dan kurkumin efektif menghambat proliferasi, menginduksi kematian sel, dan menekan migrasi sel kanker, dengan efektivitas terbukti dalam model 2D dan 3D spheroid. Temuan ini mendukung potensinya sebagai strategi terapi untuk kanker payudara, pada kanker payudara luminal dan TNBC dengan risiko metastasis tinggi.

Kata Kunci: PGV-1, kurkumin, kanker payudara *triple-negative* 4T1, luminal T47D, efek kombinasi, spheroid 3D.

ABSTRACT

The high incidence of breast cancer and the emergence of resistance to conventional chemotherapy are significant challenges in its treatment. This condition encourages the development of new anticancer agents that are more effective and selective. Pentagamavunon-1 (PGV-1), a synthetic curcumin derivative, shows potential anticancer activity through specific mechanisms, such as cell cycle arrest in the G2/M phase, induction of mitotic catastrophe, increased oxidative stress, and triggering apoptosis. Unlike many conventional chemotherapeutic agents, PGV-1 shows high selectivity for cancer cells compared to normal cells, thus potentially reducing systemic side effects commonly occurring in standard therapies such as doxorubicin, tamoxifen, or cisplatin. Although the efficacy of PGV-1 monotherapy in vitro and preclinically is still lower than existing standard therapies, its specific mechanism of action profile and good selectivity make PGV-1 a worthy candidate to continue to be developed as a new chemotherapeutic agent. Efforts have been made to combine PGV-1 with other natural compounds such as piperine, diosmin, and galanin. Still, the results are not optimal because the antiproliferative and apoptotic effects produced are limited and require high doses. To improve the effectiveness of therapy, curcumin, a natural compound known to have anticancer activity, was chosen to be combined with PGV-1. The selection of curcumin was based on the similarity of various mechanisms of action and molecular targets with PGV-1 that can complement the mechanism of action of PGV-1, such as the reactive oxygen species (ROS) pathway, cell cycle regulation, and apoptosis induction so that the combination of both has the potential to produce a synergistic effect as a strategy to increase the effectiveness of therapy. In addition, curcumin shows higher effectiveness individually than other natural compounds that have previously been combined with PGV-1. This profile offers advantages in terms of efficacy, selectivity, and availability. Because the previous combination has not produced optimal effects, curcumin was chosen as a new candidate with more potential to be combined with PGV-1. This study aims to evaluate the combination of PGV-1 and curcumin as candidate chemotherapy agents in triple-negative and luminal breast cancer by assessing the antiproliferative effects, apoptosis induction, and antimetastasis potential through various parameters in 2D and 3D models to examine the effectiveness and selectivity of its therapy.

This study used two experimental approaches, namely 2D monolayer cell culture and 3D spheroid model, to evaluate the effects of the combination of PGV-1 and curcumin on breast cancer cells. As a basis for exploration, 2D monolayer cell culture was used to study the initial response of cancer cells to the combination of PGV-1 and curcumin. In contrast, the 3D spheroid culture model is needed to evaluate the effectiveness of this combination in a more complex environment that resembles the physiological conditions of tumors in vivo; it is expected that both complement each other in providing a comprehensive picture of its therapeutic potential. Cytotoxicity assay using the MTT method was used to determine the IC₅₀ value of compounds and combinations. Cell cycle analysis was carried out using propidium iodide staining. At the same time, apoptosis was evaluated by annexin

V/PI staining and oxidative stress was measured by DCFDA staining to identify intracellular ROS through flow cytometry-based detection. The incidence of mitotic catastrophe was analyzed by May-Grünwald-Giemsa staining, and cellular senescence was detected by SA- β -gal staining. Anti-cell migration activity was assessed by wound healing assay, and MMP-2 and MMP-9 expression were analyzed by gelatin zymography. After obtaining initial data from 2D culture, the study was continued with a 3D spheroid model to evaluate the therapeutic effect under conditions closer to the original tumor's nature. The 3D spheroid model was formed using agarose-based culture on a flat-bottom plate, and evaluation included measuring spheroid size, Ki-67 expression for cell proliferation, cleaved caspase-3 for apoptosis, and SA- β -gal for cellular senescence. Immunohistochemistry for cleaved caspase-3 and Ki-67 was only performed on the 3D spheroid model, allowing for a more in-depth analysis of the cancer cell response in the context of a three-dimensional tumor.

The results showed that PGV-1 had a single cytotoxic effect with an IC_{50} of 4 μ M on 4T1 cells and two μ M on T47D cells. Meanwhile, curcumin showed an IC_{50} of 40 μ M on 4T1 cells and 20 μ M on T47D cells. Compared with normal Vero and NIH-3T3 cells, the selectivity index of PGV-1 and curcumin on both cancer cells was more than 3, indicating that both compounds had good selectivity against cancer cells. The cytotoxic effect of the combination of PGV-1 and curcumin has a synergistic impact (combination index <0.7) in reducing the viability of 4T1 and T47D cells. In 2D models, the combination caused increased cell cycle arrest in the G2/M and sub-G1 phases, with accumulation of sub-G1 cells by up to 80% in 4T1 and 75% in T47D. Total apoptosis was increased by up to 85% in 4T1 and 80% in T47D. The combination also increased ROS levels by 1.5-fold compared to control and induced cell senescence by up to 60% in 4T1 and 50% in T47D without affecting the viability of normal Vero and NIH-3T3 cells. In addition, the combination suppressed cancer cell migration by up to 70% in 4T1 and 60% in T47D and decreased MMP-2 and MMP-9 expression. In 3D spheroid models, the combination significantly inhibited spheroid growth, with volume reductions of 70% in 4T1 and 65% in T47D, decreased Ki-67 expression, and increased cleaved caspase-3 expression. These findings support the potential of the combination of PGV-1 and curcumin as a therapeutic strategy for triple-negative breast cancer (TNBC), which has a high risk of metastasis, as well as the luminal subtype, which has the highest incidence. In conclusion, the combination of PGV-1 and curcumin effectively inhibits proliferation, induces cell death, and suppresses migration of cancer cells, with efficacy proven in 2D and 3D spheroid models. These findings support its potential as a therapeutic strategy for breast cancer in both luminal breast cancer and TNBC with a high risk of metastasis.

Keywords: PGV-1, curcumin, triple-negative breast cancer 4T1, luminal T47D, combination effect, 3D spheroid.