

KUMARIN 8-HIDROKSIISOKAPNOLAKTON-2',3'- DIOL DARI DAUN *Micromelum minutum*: AKTIVITAS SITOTOKSIK DAN EFEKNYA TERHADAP EKSPRESI Bcl-2 SEL MIELOMA

*Coumarin 8-Hydroxyisocapnolactone-2',3'- Diol from
Micromelum minutum Leaves: Cytotoxic activity and Its
effect on the Expression of Bcl-2 in Myeloma Cell Line*

Alfi Yasmina¹, Mustofa², dan Ratna Asmah Susidarti³

*Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar & Biomedis
Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada*

ABSTRACT

Multiple myeloma shows resistance to chemotherapy after being treated for some time, and one of the causes is overexpression of Bcl-2. Several coumarins had been shown to have cytotoxic activity, and one of them, i.e. imperatorin, caused apoptosis on cancer cells by suppressing the expression of Bcl-2. Coumarin 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol, isolated from *Micromelum minutum* leaves, has showed cytotoxic activity on several cancer cell lines.

The aims of this study were to find out whether coumarin 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol has cytotoxic activity on myeloma cell line and whether the effect was caused through apoptotic process by suppressing the expression of Bcl-2. Cytotoxicity assay was performed on myeloma cell line NS-1, using trypan blue exclusion assay (doxorubicine was used as positive control). Expression of Bcl-2 was examined with immunohistochemistry method.

The result showed that coumarin 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol has cytotoxic activity on myeloma cell line NS-1, and the IC₅₀ were 4.16 µg/ml (24 hours), 4.22 µg/ml (48 hours), and 2.78 µg/ml (72 hours). The coumarin also suppressed the expression of Bcl-2 with IC₅₀ of 17.88 mg/ml. In conclusion, coumarin 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol showed cytotoxic activity on myeloma cell line, and it was achieved by suppressing the expression of Bcl-2.

Keywords: *Coumarin - 8-hydroxyisocapnolactone-2',3'-diol - M. minutum - cytotoxic - expression of Bcl-2 - myeloma cell line*

1. Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru
2. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
3. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENGANTAR

Mieloma multipel merupakan keganasan proliferasi sel plasma monoklonal, dengan ciri khas trias infiltrasi sumsum tulang oleh sel plasma, lesi litik tulang, dan *M-protein* dalam serum atau urin¹. Insidensi mieloma multipel tahun 2000 di seluruh dunia adalah 73,9 per 1000 orang, dengan mortalitas sebesar 57,4 per 1000 orang, sementara di Indonesia pada tahun 2000 terdapat 1600 orang yang menderita mieloma multipel, dan 1315 orang kemudian meninggal^{2,3}. Mieloma, bersama limfoma, merupakan penyebab kematian ketujuh dari semua kanker, sesudah kanker saluran nafas, lambung, hati, kolon-rektum, payudara, dan esofagus⁴.

Terapi untuk mieloma terdiri dari kemoterapi, obat analgetik dan radioterapi lokal, terapi hiperkalsemia dengan rehidrasi, pemberian diuretik, dan terapi bifosfonat, terapi gangguan ginjal, terapi anemia, DAN terapi infeksi¹. Kemoterapi yang telah digunakan pada mieloma antara lain adalah senyawa pengalkil melfalan, siklofosamid, klorambusil, prednison, vinkristin, dan doksorubisin⁵. Terapi dengan kemoterapi konvensional (melfalan dan prednison) ternyata hanya memberikan tingkat respon total 40-60% dan harapan hidup antara 3-4 tahun. Hampir semua pasien akhirnya mengalami relaps dan menderita resistensi obat⁶. Pemberian kombinasi kemoterapi, kemoterapi dosis tinggi dan transplantasi sel induk autolog telah membantu mengatasi resistensi^{7,8}, namun pemberian dosis tinggi dan kombinasi kemoterapi bisa meningkatkan efek samping, sedangkan transplantasi sel induk autolog sangat mahal.

Salah satu penyebab resistensi obat kanker pada mieloma adalah karena terjadinya overekspresi Bcl-2, sehingga terjadi penghambatan apoptosis pada sel mieloma⁹. Dengan demikian, penemuan obat yang bisa menurunkan ekspresi Bcl-2 pada sel mieloma sangat diperlukan untuk mengatasi resistensi terhadap antikanker yang ada saat ini. Berbagai studi menunjukkan bahwa kumarin mempunyai efek sitotoksik terhadap berbagai sel kanker. Imperatorin, kumarin dari akar *Angelica dahurica* (Umbelliferae) menimbulkan efek antikanker dengan menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria, yaitu melalui depolarisasi membran mitokondria, penurunan ekspresi Bcl-2, pelepasan sitokrom c dari mitokondria, pengaktifan caspase-9 dan caspase-3, serta fragmentasi *Poly(ADP-Ribose) Polymerase* (PARP)¹⁰.

Kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol yang diisolasi dari daun *Micromelum minutum*, menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel leukemia T-limfoblastik (CEM-SS), leukemia promielositik (HL60), kanker leher

rahim (HeLa) dan kanker hati (HepG2) (Susidarti, 2003). Namun penelitian terhadap efek sitotoksik zat ini terhadap sel mieloma dan bagaimana pengaruhnya terhadap mekanisme apoptosis belum pernah dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas sitotoksik kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol terhadap sel mieloma dan apakah efek sitotoksik itu ditimbulkan melalui apoptosis dengan melakukan penghambatan ekspresi Bcl-2.

CARA PENELITIAN

1. Kultur sel mieloma

Sel mieloma NS-1 dari tangki nitrogen cair dicairkan dengan *waterbath* suhu 37°C, kemudian disemprot alkohol 80%. Sel dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang berisi 10 ml medium RPMI 1640-serum, dan disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, endapan yang terbentuk ditambah dengan RPMI 1640-serum. Setelah didiamkan 20 menit, sel disentrifus dengan kecepatan 1200 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, disisakan 1 ml untuk resuspensi. Suspensi sel dimasukkan ke dalam *Tissue Culture Flask* (TCF) dengan media penumbuh yang mengandung *Fetal Bovine Serum* (FBS) 20%, dan dilihat di bawah mikroskop. Sel hidup nampak bulat, jernih, dan bersinar. TCF yang berisi sel diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C dan CO₂ 5%. Bila sel telah memenuhi *flask*, sel dapat didistribusikan menjadi beberapa TCF.

2. Uji sitotoksik dengan metode *trypan blue exclusion assay*

Penelitian dilakukan dengan menggunakan *microplate* 96 *well*. Jumlah sel mieloma yang digunakan adalah 50000/*well*. Sel mieloma diberi perlakuan dengan kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dengan konsentrasi 20, 10, 5, 2,5, 1, dan 0,5 mg/ml. Doksorubisin digunakan sebagai kontrol positif, dengan konsentrasi yang sama. Dimetilsulfoksid (DMSO), pelarut kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol, diberikan dengan konsentrasi 2% (v/v), yang merupakan konsentrasi tertinggi untuk melarutkan kumarin tersebut, sebagai kontrol pelarut. *Microplate* diinkubasi selama 24, 48, dan 72 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C dan CO₂ 5%. Sesudah masa inkubasi tersebut, aktivitas sitotoksik diperiksa dengan menggunakan *trypan blue*. *Trypan blue* diberikan sebanyak 50 ml ke dalam *well*. Setelah tercampur, diambil 10 ml, diletakkan pada hemositometer, lalu diperiksa di bawah mikroskop cahaya dan dihitung jumlah sel yang hidup. Persentase kematian ditentukan dengan rumus berikut: [(sel hidup pada kontrol negatif - sel

hidup pada perlakuan)/(sel hidup pada kontrol negatif] \times 100%.

3. Uji ekspresi Bcl-2

Sel dikultur pada *microplate* 96 well dan diinkubasi selama 24 jam. Sel kemudian dibuat apusan pada gelas objek. Preparat direndam dalam hidrogen peroksida 3% (H_2O_2 dalam metanol) selama 20 menit untuk menghambat aktivitas peroksidase endogen, kemudian dilakukan pencucian dengan air, lalu dengan akuades selama 15 menit. Preparat diletakkan dalam EDTA 1 mM (pH 8,0), lalu dimasukkan ke dalam *microwave*. Preparat diletakkan dalam *normal mouse serum* (1 :50) selama 15 menit. Perendam dibuang, dan preparat ditetesi dengan antibodi monoklonal anti-bcl-2 (pengenceran 1:50) selama 60 menit. Preparat dicuci 3 kali dalam PBS dengan pH 7,4. Preparat diinkubasi dalam antibodi sekunder selama 15 menit, 1:2 dalam PBS ditambah 5% AB serum. Preparat dicuci lagi 3 kali dengan PBS pH 7,4. Kemudian preparat diinkubasi dalam *avidin-biotin-complex* selama 15 menit, 1:2 dalam PBS ditambah 5% AB serum. Preparat dicuci lagi 3 kali dengan PBS pH 7,4. Preparat diinkubasi dalam DAB selama 3-8 menit. Preparat dicuci dengan air, lalu dengan akuades. Preparat direndam dalam hematoksin selama 3-4 menit, lalu dicuci dengan air. Dengan mikroskop cahaya pembesaran 100-400x, ekspresi Bcl-2 sel mieloma diamati. Sitoplasma sel yang mengekspresikan Bcl-2 berwarna coklat, dan yang tidak mengekspresikan Bcl-2 berwarna ungu. Sel yang mengekspresikan Bcl-2 dihitung setiap 100 sel. Data uji sitotoksik dan ekspresi Bcl-2 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dikontrol dengan data DMSO.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji sitotoksik sel mieloma sesudah inkubasi selama 24, 48, dan 72 jam dengan 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin disajikan pada Tabel 1.

Hasil uji sitotoksik DMSO (kontrol pelarut) terhadap sel mieloma tidak berbeda bermakna dengan kontrol negatif ($p > 0,05$, CI 95%), yang menunjukkan bahwa DMSO tidak menimbulkan kematian pada sel mieloma, sehingga hasil uji sitotoksik 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol tidak dikurangi dengan hasil uji sitotoksik pelarutnya, yaitu DMSO.

Hubungan antara konsentrasi 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin dan persentasi kematian sel mieloma sesudah inkubasi 24, 48, dan 72 jam ditunjukkan dalam bentuk grafik log pada Gambar 1.

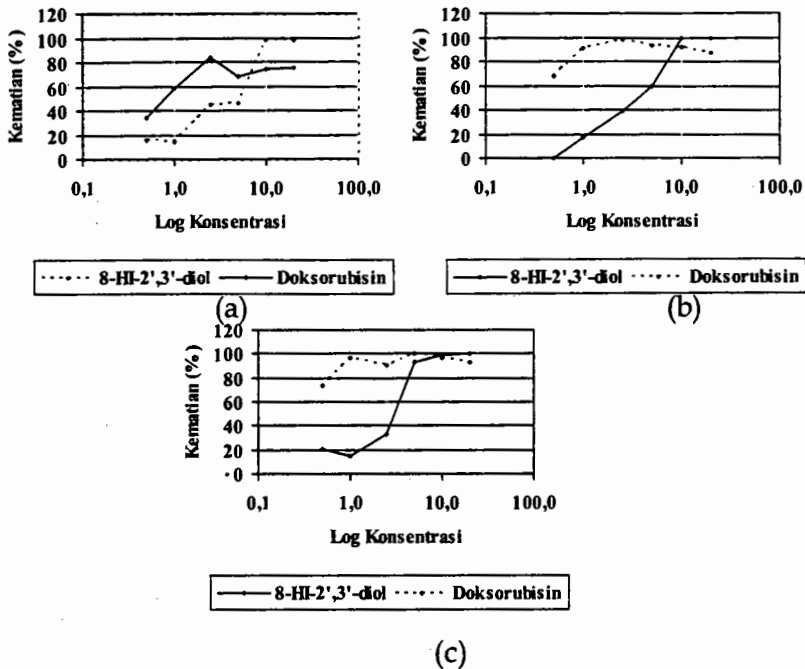
Tabel 1. Persentase kematian sel mieloma sesudah inkubasi dengan 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin

Senyawa	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Kematian (% \pm SD)		
		24 jam	48 jam	72 jam
Kontrol Negatif	0,0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
8-hidroksi- isokapnolakton -2',3'-diol	20,0	98,68 \pm 2,28	99,26 \pm 1,28	100,00 \pm 0,00
	10,0	98,03 \pm 0,00	99,26 \pm 1,28	99,09 \pm 1,58
	5,0	46,05 \pm 6,03	58,82 \pm 12,93	93,64 \pm 3,15
	2,5	44,74 \pm 17,21	38,23 \pm 4,41	33,64 \pm 15,02
	1,0	15,13 \pm 12,00	16,91 \pm 22,53	14,55 \pm 10,33
	0,5	15,35 \pm 19,17	0,00 \pm 0,00	21,21 \pm 22,88
Doksorubisin	20,0	75,66 \pm 7,97	87,50 \pm 6,37	92,73 \pm 4,16
	10,0	74,34 \pm 0,00	92,65 \pm 3,37	96,37 \pm 3,15
	5,0	67,76 \pm 8,22	93,38 \pm 4,41	100,00 \pm 0,00
	2,5	84,21 \pm 6,84	98,53 \pm 1,28	90,91 \pm 13,45
	1,0	58,55 \pm 10,44	90,44 \pm 5,09	97,27 \pm 4,72
	0,5	34,21 \pm 13,87	67,65 \pm 16,26	73,63 \pm 3,15

Dari Tabel 1 dan Gambar 1(a), terlihat bahwa pada masa inkubasi 24 jam, dengan peningkatan konsentrasi senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol, persentase kematian sel mieloma semakin meningkat, bahkan pada konsentrasi tertinggi, yaitu 20 mg/ml, kematiannya mencapai 98,68% (hampir 100%). Peningkatan ini terjadi secara perlahan pada dosis-dosis kecil, dan meningkat cepat di antara dosis 5-10 mg/ml, dan sesudah itu mendatar. Sebaliknya, doksorubisin menimbulkan peningkatan kematian yang cepat pada dosis sangat rendah, kemudian mulai melambat pada dosis-dosis besar. Pada dosis 20 mg/ml, diperoleh kematian sel sebesar 75,66%.

Hal yang sama terlihat pada inkubasi 48 jam dan 72 jam. Dosis tertinggi senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol menimbulkan kematian sebesar 99,26% (48 jam) dan 100% (72 jam). Dosis tertinggi doksorubisin menimbulkan kematian sebesar 87,5% (48 jam) dan 92,73% (72 jam).

Aktivitas sitotoksik senyawa uji terhadap sel mieloma dinyatakan sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} untuk senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin untuk tiap masa inkubasi ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 1. Grafik hubungan antara log konsentrasi 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan dokсорubisin dengan persentase kematian sel mieloma setelah inkubasi 24 jam (a), 48 jam (b) dan 72 jam (c)

Tabel 2. Nilai IC_{50} 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan dokсорubisin terhadap sel mieloma, dengan metode *trypan blue exclusion assay*

Senyawa	IC_{50} ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$)		
	24 jam	48 jam	72 jam
8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol	4,16 \pm 0,48	4,22 \pm 0,50	2,78 \pm 0,56
Dokсорubisin	1,16 \pm 0,34	0,49 \pm 0,54	0,43 \pm 0,18

Dari tabel di atas, terlihat bahwa IC_{50} senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol adalah sebesar 4,16 $\mu\text{g/ml}$ (24 jam), 4,22 $\mu\text{g/ml}$ (48 jam) dan 2,78 $\mu\text{g/ml}$ (72 jam). Jadi dengan penambahan masa inkubasi, senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol semakin toksik terhadap sel mieloma NS-1. Namun, ketika dianalisis dengan uji *Oneway Anova*, IC_{50} untuk masa inkubasi 24 dan 48 jam tidak berbeda bermakna. Sedangkan doksorubisin mempunyai IC_{50} yang jauh lebih rendah, yaitu 1,16 $\mu\text{g/ml}$ (24 jam), 0,49 $\mu\text{g/ml}$ (48 jam) dan 0,43 $\mu\text{g/ml}$ (72 jam). Di sini juga terlihat bahwa dengan semakin meningkatnya masa inkubasi, doksorubisin semakin toksik terhadap sel mieloma NS-1. Analisis dengan *Oneway Anova* dengan CI 95% menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p = 0,03$) antara IC_{50} antara masa inkubasi 24 jam dengan masa inkubasi lainnya.

Dari analisis statistik uji t (CI 95%) yang dilakukan untuk melihat perbedaan antara IC_{50} senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan IC_{50} doksorubisin, diperoleh adanya perbedaan bermakna pada masa inkubasi 24, 48 dan 72 jam (berturut-turut $p = 0,015$, $p = 0,005$ dan $p = 0,019$). Ini menunjukkan bahwa doksorubisin jauh lebih sitotoksik daripada senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol.

Uji sitotoksik yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa ini secara signifikan toksik terhadap sel leukemia T-limfoblastik (CEM-SS), sel leukemia promyelositik (HL60), sel kanker leher rahim (HeLa), dan sel kanker hati (HepG2) dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut sebesar 2,9, 2,5, 6,9 dan 5,9 $\mu\text{g/ml}$ ¹¹. Bila dibandingkan dengan nilai IC_{50} masa inkubasi 24 jam yang diperoleh dengan cara *trypan blue exclusion assay*, terlihat bahwa IC_{50} untuk sel mieloma (NS-1) lebih tinggi dibanding IC_{50} untuk sel kanker darah, tetapi lebih rendah daripada IC_{50} untuk sel kanker yang solid.

Kumarin lain telah banyak dilaporkan mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker. Auraptene dari *grapefruit* bersifat sitotoksik terhadap kanker kolorektal¹², mikromelin bersifat sitotoksik terhadap leukemia limfositik P-388, daphnetin mempunyai efek sitotoksik terhadap sel kanker hati HepG2¹³, dan imperatorin menunjukkan aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia promielositik HL60¹⁰. Mikrominutin, yang juga diperoleh dari *M. minutum*, menunjukkan aktivitas sitotoksik lemah terhadap leukemia limfositik¹⁴.

Aktivitas sitotoksik tersebut di atas hanya menunjukkan kemampuan kumarin untuk membunuh sel, tetapi tidak mampu menunjukkan secara jelas mekanisme kematian yang terjadi. Dalam penatalaksanaan kanker, pemberian obat yang menimbulkan efek apoptosis, apalagi dengan

mekanisme spesifik terhadap salah satu komponen apoptosis, akan memberikan efek lebih menguntungkan bagi penderita kanker. Sel mieloma telah dilaporkan menunjukkan resistensi terhadap kemoterapi konvensional, dan salah satu penyebabnya adalah overekspresi Bcl-2⁹. Pada penelitian ini, dikaji efek kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol terhadap ekspresi Bcl-2 sel mieloma, dengan menggunakan metode imunohistokimia. Gambar 2 Menunjukkan gambaran ekspresi Bcl-2 pada sel mieloma.



Gambar 2. Uji imunohistokimia ekspresi Bcl-2 pada sel mieloma NS-1. Tampak sel yang tidak mengekspresikan Bcl-2 menunjukkan sitoplasma berwarna ungu, pada kelompok kontrol (a) dan sel yang mengekspresikan Bcl-2 menunjukkan sitoplasma berwarna coklat, pada kelompok senyawa uji (b). (Mikroskop cahaya, pembesaran 400x).

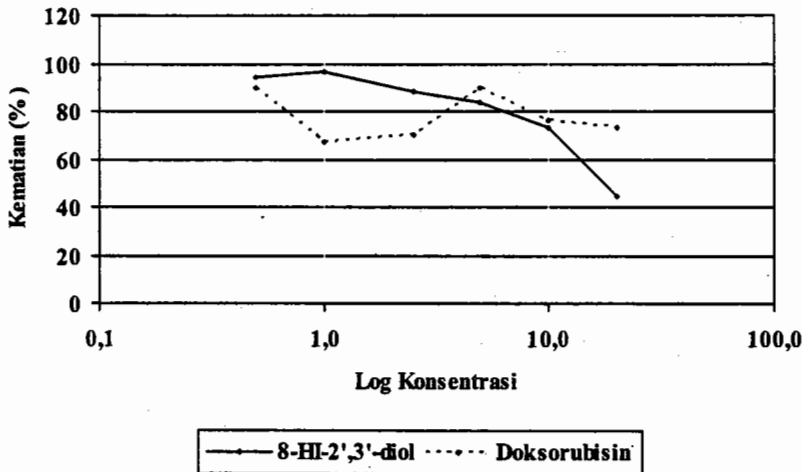
Hasil uji imunohistokimia terhadap sel mieloma ditunjukkan pada Tabel 3 dan Gambar 3.

Data hasil uji sitotoksik DMSO (kontrol pelarut) terhadap sel mieloma ternyata berbeda bermakna dengan kontrol negatif, sehingga data hasil uji sitotoksik 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dikurangi dengan data hasil uji sitotoksik DMSO.

Pada Tabel 3 dan Gambar 3, terlihat bahwa setelah inkubasi 24 jam, dengan peningkatan konsentrasi senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol, terjadi penurunan ekspresi Bcl-2 sel mieloma. Pada konsentrasi 20 mg/ml, ekspresi Bcl-2-nya hanya 44,69%. Sebaliknya pada doksorubisin, penambahan konsentrasi nampaknya tak mempengaruhi ekspresi Bcl-2. Ini menunjukkan bahwa senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol mampu menurunkan ekspresi Bcl-2 sel mieloma, sedangkan doksorubisin tidak.

Tabel 3. Rerata dan persentase ekspresi Bcl-2 sel mieloma sesudah inkubasi selama 24 jam dengan 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin

Senyawa	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Rerata Ekspresi Bcl-2 (\pm SD)	Ekspresi Bcl-2 ($\% \pm$ SD)
Kontrol Negatif	0,0	81,67 \pm 3,51	100,00 \pm 0,00
8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol	20,0	36,49 \pm 3,51	44,69 \pm 4,30
	10,0	59,67 \pm 4,36	73,07 \pm 5,34
	5,0	68,34 \pm 6,03	83,68 \pm 7,38
	2,5	72,34 \pm 1,15	88,57 \pm 1,41
	1,0	79,00 \pm 3,05	96,74 \pm 3,74
	0,5	77,00 \pm 2,31	94,29 \pm 2,82
Doksorubisin	20,0	60,00 \pm 0,00	73,47 \pm 0,00
	10,0	62,50 \pm 3,53	76,53 \pm 4,33
	5,0	75,00 \pm 14,14	89,79 \pm 14,43
	2,5	57,50 \pm 10,61	70,40 \pm 12,99
	1,0	55,00 \pm 7,07	67,34 \pm 8,66
	0,5	75,00 \pm 14,14	89,79 \pm 14,43



Gambar 3. Grafik hubungan antara log konsentrasi 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin dengan persentase ekspresi Bcl-2 sel mieloma setelah inkubasi selama 24 jam

Nilai IC_{50} penghambatan ekspresi Bcl-2 senyawa uji terlihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai IC₅₀ penghambatan ekspresi Bcl-2 sel mieloma sesudah inkubasi selama 24 jam dengan 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol dan doksorubisin

Senyawa	IC ₅₀ (μg/ml ± SD)
8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol	17,88 ± 0,37
Doksorubisin	68,63 ± 9,22

Pada Tabel 4, bisa dilihat bahwa nilai IC₅₀ penghambatan ekspresi Bcl-2 senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol adalah 17,88%. Hasil uji ekspresi Bcl-2 dengan doksorubisin menghasilkan IC₅₀ yang sangat tinggi, menunjukkan tak adanya efek penurunan ekspresi Bcl-2.

Dari uji ekspresi Bcl-2 ini, diperoleh hasil bahwa kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol menimbulkan penurunan ekspresi Bcl-2. Senyawa kumarin lain yang menunjukkan hal yang sama adalah imperatorin, yang menimbulkan apoptosis terhadap sel HL60 dengan menurunkan ekspresi Bcl-2, selain juga terdapat mekanisme lain yaitu dengan mendepolarisasi membran mitokondria, melepaskan sitokrom c, mengaktivasi caspase-9 dan caspase-3, serta menimbulkan fragmentasi PARP¹⁰.

Bcl-2 adalah salah satu regulator kunci yang mengendalikan pelepasan sitokrom c dan faktor-faktor pemacu apoptosis lainnya dari mitokondria¹⁵. Pada sel yang mengoverekspresikan Bcl-2, Bcl-2 menghambat apoptosis dengan berinteraksi dengan Bax/Bak, dengan membentuk heterodimer yang menginaktivasi Bax/Bak, sehingga mencegah terjadinya permeabilitas membran mitokondria dan pelepasan sitokrom c¹⁶. Jadi sebenarnya apoptosis sangat tergantung pada rasio Bcl-2 dan Bax/Bak, yang pada penelitian ini tidak diperiksa. Tetapi, apoptosis lebih mungkin terjadi bila kadar protein Bcl-2 rendah¹⁷.

Dengan pemberian senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol, akan terjadi apoptosis melalui jalur mitokondria. Dengan terjadinya penurunan onkoprotein Bcl-2, Bax/Bak akan menimbulkan permeabilitas membran mitokondria dan mengakibatkan pelepasan sitokrom c. Begitu berada dalam sitoplasma, sitokrom c berikatan dengan Apaf-1, yang akan mengaktivasi caspase-9. Caspase-9 yang aktif akan menimbulkan fragmentasi terhadap caspase-3, -6, dan -7. Caspase efektor ini akan memfragmentasi substrat intrasel, dan mengakibatkan perubahan morfologi seperti kondensasi kromatin, fragmentasi DNA, pecahnya membran nukleus, eksternalisasi fosfatidilserin, dan pembentukan *apoptotic bodies*^{18,19}. Pada penelitian ini yang terbukti baru kemampuan

kumarin ini menghambat ekspresi Bcl-2, sedangkan parameter-parameter apoptosis lain pada jalur apoptosis melalui mitokondria masih belum terbukti. Untuk ini perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui apakah kumarin ini benar-benar menimbulkan apoptosis melalui jalur mitokondria, dan bukan tidak mungkin kumarin ini juga menimbulkan efek melalui jalur ekstrinsik.

Doksorubisin tak menunjukkan kemampuan menurunkan ekspresi Bcl-2. Ini sesuai dengan penelitian oleh Huigsloot *et al.*²⁰ yang menunjukkan bahwa disfungsi mitokondria yang ditimbulkan oleh mitokondria tidak tergantung pada *checkpoint* yang dikendalikan oleh caspase ataupun Bcl-2. Pada penelitian Lorenzo *et al.*²¹, ditunjukkan bahwa doksorubisin menimbulkan apoptosis melalui jalur mitokondria, dan *p53* berperan dalam hal ini. Pada penelitian ini juga terjadi *downregulation* Bcl-2, namun karena penelitian ini dilakukan pada sel normal (HUVEC), diduga sel ini memang menunjukkan ekspresi Bcl-2 yang rendah. Penelitian oleh Kalivendi *et al.*²² menunjukkan adanya mekanisme lain yang ditimbulkan oleh doksorubisin dalam menimbulkan apoptosis, yaitu dengan meningkatkan transkripsi dan ekspresi protein *nitric-oxide synthase*, sehingga terjadi aktivasi redoks doksorubisin, menghasilkan radikal bebas superoksida, yang kemudian akan memicu pengeluaran sitokrom c dari mitokondria. Mekanisme yang multipel inilah yang mungkin membuat aktivitas sitotoksik doksorubisin dalam penelitian ini lebih besar daripada senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol.

Karena tingginya angka kegagalan terapi klinis pada sel mieloma yang mengoverekspresikan Bcl-2, penemuan obat yang mampu menekan ekspresi Bcl-2 sangat bermanfaat. Inhibisi sementara terhadap Bcl-2 mungkin tidak toksik terhadap sel yang normal¹⁶. Penatalaksanaan sel tumor yang mengekspresikan Bcl-2 memerlukan obat yang menginaktivasi atau menghindari fungsi apoptosis protein Bcl-2. Taxol, salah satu obat kanker yang telah diuji coba klinis untuk mieloma multipel terbukti mampu menginduksi fosforilasi dan menginaktivasi Bcl-2^{23,24}. Dengan penelitian yang telah dilakukan pada senyawa 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol ini, terbukti bahwa senyawa ini mampu menurunkan ekspresi Bcl-2, sehingga sesudah penelitian-penelitian lebih lanjut terhadap proses apoptosis yang ditimbulkan senyawa ini, diharapkan senyawa ini bisa dikembangkan menjadi salah satu obat untuk mieloma yang menunjukkan overekspresi Bcl-2.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa kumarin 8-hidroksiisokapnolakton-2',3'-diol mempunyai efek sitotoksik terhadap sel mieloma NS-1 dengan menimbulkan apoptosis melalui penghambatan ekspresi Bcl-2. IC_{50} senyawa ini adalah sebesar 4,16 $\mu\text{g/ml}$ (24 jam), 4,22 $\mu\text{g/ml}$ (48 jam), dan 2,78 $\mu\text{g/ml}$ (72 jam), sedangkan IC_{50} penghambatan ekspresi Bcl-2 senyawa ini adalah sebesar 17,88 $\mu\text{g/ml}$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Singer, C.R.J. 1997. ABC of Clinical Haematology: Multiple Myeloma and Related Conditions. *BMJ* 314: 960.
2. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. 2001. Estimating the World Cancer Burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94: 153-156.
3. Globocan. 2001. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide Version 1.0. *IARC CancerBase No.5*. IARC Press, Lyon.
4. Shibuya, K., Mathers, C.D., Boschi-Pinto, C., Lopez, A.D., and Murray, C.J.L. 2002. Global and Regional Estimates of Cancer Mortality and Incidence by Site: II. Results for the Global Burden of Disease 2000. *BMC Cancer* 2(37).
5. Longo, D.L. 2001. Plasma Cell Disorders. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine 15th Edition on CD-ROM*. McGraw-Hill, USA.
6. Hussein, M.A. 2002. Nontraditional Cytotoxic Therapies for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *The Oncologist* 7 (Suppl 1): 20-29.
7. Rajkumar, S.V., Leong, T., Roche, P.C., Fonseca, R., Dispenzieri, A., Lacy, M.Q., Lust, J.A., Witzig, T.E., Kyle, R.A., Gertz, M.A., and Greipp, P.R. 2000. Prognostic Value of Bone Marrow Angiogenesis in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 6: 3111-3116.
8. Child, J.A, Morgan, G.J., Davies, F.E., Owen, R.G., Bell, S.E., Hawkins K., Brown, J., Drayson, M.T., and Selby, P.J. 2003. High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 348(19): 1875-1883.
9. Hallek, M., Bergsagel, P.L., and Anderson, K.C. 1998. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for A Multistep Transformation Process. *Blood* 91 (1): 3-21.
10. Pae, H.-O., Oh, H., Yun, Y.-G., Oh, G.-S., Jang, S.I., Hwang, K.-M., Kwan, T.-O., Lee, H.-S., and Chung, H.-T. 2002. Imperatorin, a Furanocoumarin from *Angelica dahurica* (Umbelliferae), Induces Cytochrome c-Dependent Apoptosis in Human Promyelocytic Leukaemia, HL-60 Cells. *Pharmacol Toxicol* 91(1): 40
11. Susidarti, R.A. 2003. Chemical Constituents and Biological Activities of *Micromelum minutum* (Rutaceae) and Two Eugenia Species (Myrtaceae). *Ph.D Thesis*, Universiti Putra Malaysia, Malaysia.
12. Park, E.J. and Pezzuto, J.M. 2002. Botanicals in Cancer Chemoprevention. *Cancer*

Metastasis Rev 21: 231-255.

13. Ojala, T. 2001. Biological Screening of Plant Coumarins. *Academic Dissertation*. Department of Pharmacy, Faculty of Science, University of Helsinki, Finland.
14. Tantivatana, P., Ruangrunsi, N., Vaisiroj, V., Lankin, D.C., Bhacca, N.S., Borris, R.P., Cordell, G.A., and Johnson, L.F. 1983. Microminutin, A Novel Cytotoxic Coumarin from *Micromelum minutum* (Rutaceae). *J Org Chem* 48: 268-270.
15. Kaufmann, S.H., and Hengartner, M.O. 2001. Programmed Cell Death: Alive and Well in the New Millennium. *Trends Cell Biol* 11(12): 526-534.
16. Schimmer, A.D., Hedley, D.W., Penn, L.Z., and Minden, M.D. 2001. Receptor- and Mitochondrial-Mediated Apoptosis in Acute Leukemia: A Translational View. *Blood* 98 (13): 3541-3553.
17. Eisel, D., Fergh, G., Fischer, B., Manzow, S., and Schmelg, K. (Eds). 2000. *Guide to Cell Proliferation and Apoptosis Methods*. Roche Diagnostic Corporation, pp 24-26, 36-38.
18. Wang, X. 2001. The Expanding Role of Mitochondria in Apoptosis. *Genes Developm* 15: 2922-2933.
19. Zeiss, C.J. 2003. The Apoptosis-Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol* 40: 481-495.
20. Huigsloot, M., Tijdens, I.B., Mulder, G.J., and van de Water, B. 2002. Differential Regulation of Doxorubicin-Induced Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis by bcl-2 in Mammary Adenocarcinoma (MTLn3) Cells. *J Biol Chem* 277 (39): 35869-35879.
21. Lorenzo, E., Ruiz-Ruiz, C., Quesada, A.J., Hernández, G., Rodríguez, A., López-Rivas, A., and Redondo, J.M. 2002. Doxorubicin Induces Apoptosis and CD95 Gene Expression in Human Primary Endothelial Cells through a p53-Dependent Mechanism. *J Biol Chem* 277 (17): 10883-10892.
22. Kalivendi S.V., Kotamraju, S., Zhao, H., Joseph, J., and Kalyanaraman, B. 2001. Doxorubicin-Induced Apoptosis is Associated with Increased Transcription of Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *J Biol Chem* 276 (50): 47266-47276.
23. Lowe, S.W., and Lin, A.W. 2000. Apoptosis in Cancer. *Carcinogenesis* 21 (3): 485-495.
24. Barrett, C.M., Lewis, F.L., Roatan, J.B., Sweatman, T.W., Israel, M., Cleveland, J.L., and Lothstein, L. 2002. Novel Extranuclear-Targeted Anthracyclines Override the Antiapoptotic Functions of Bcl-2 and Target Protein Kinase C Pathways to Induce Apoptosis. *Mol Cancer Therapeutics* 1: 469-481.