

**EKSTRAKSI PROTEIN, IDENTIFIKASI SERTA UJI EFEK EKSTRAK BIJI
Jatropha curcas L : STUDI POTENSINYA SEBAGAI INDUKTOR APOPTOSIS**

**PROTEIN EXTRACTION, IDENTIFICATION AND THE EFFECT OF
PROTEIN EXTRACT OF *Jatropha curcas* L SEED (PEJS): IT'S POTENTIAL
AS APOPTOSIS INDUCTOR**

Atina Husaana

Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung,

atinahussaana@yahoo.com

ABSTRAK

Penelitian awal terhadap biji *Jatropha curcas* L menunjukkan adanya aktivitas khas *Ribosome-Inactivating Protein* (RIP), suatu famili protein yang mampu menghambat sintesis protein. Beberapa RIP tanaman lain sudah diteliti mempunyai potensi sebagai anti kanker, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek biji *Jatropha curcas* L yang mengarah pada potensinya sebagai anti kanker, khususnya sebagai induktor apoptosis. Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L (EPBJ) serta potensinya untuk dikembangkan sebagai anti kanker. Sedangkan tujuan khususnya adalah untuk mengetahui: (1) aktivitas pemotongan DNA superkoil *in vitro*; (2) Penentuan berat molekul protein serta (3) efek induksi apoptosis dari EPBJ. EPBJ dibuat dengan ekstraksi pelarut dapar fosfat, selanjutnya diendapkan dengan ammonium sulfat. Berat molekul protein dilihat dengan elektroforesis SDS-PAGE sedangkan efek induksi apoptosis diuji pada sel HeLa dengan metode fragmentasi DNA. EPBJ dosis 20 µg sudah memperlihatkan aktivitas pemotongan DNA superkoil. Berat molekul pada fraksi aktif adalah 18,9; 25,4; 36,6; 43,5; 45,8 serta 48,8 KDa. Adapun EPBJ menunjukkan adanya efek induksi apoptosis karena mampu menyebabkan fragmentasi DNA sel HeLa. Ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L mempunyai potensi anti kanker sebagai induktor apoptosis.

Kata kunci: *Jatropha curcas* L, apoptosis, fragmentasi DNA, DNA superkoil, *Ribosome Inactivating Protein*, sel HeLa,

ABSTRACT

Previous study on Jatropha curcas L seed shows a specific Ribosome Inactivating Protein (RIP), a protein family having a capacity to inhibit protein synthesis. There has been several studies on RIP of other plants for its anti cancer potential. It leads to the need for further study to find out the anti cancer effect of Jatropha curcas L seed, especially in apoptosis induction. In general, this study is aimed at finding out the effect of protein extract of Jatropha curcas L seed (PEJS) and its potential for anticancer. This study is designed to find out : (1) the effect of in vitro cleavage of supercoiled DNA; (2) to determine the molecular weight of the protein; and (3) the effect of apoptosis induction of PEJS. Phosphate buffer was used for the PEJS extraction and Ammonium sulphate was used for protein precipitation. Molecular weight of the protein was identified using SDS-PAGE. The effect of apoptosis induction was assessed on HeLa cells using DNA fragmentation method. The DNA cleavage activity was observed at the dose of 20 µg. The molecular weight identified at the active fraction were 18,9; 25,4; 36,6; 43,5; 45,8 and 48,8 KDa. PEJS showed induction of apoptosis effect, indicated by the DNA fragmentation on HeLa cells. The protein extract of Jatropha curcas L seed has anticancer potential as an inductor of apoptosis.

Keywords: *Jatropha curcas* L, apoptosis, DNA fragmentation, supercoiled DNA, *Ribosome-Inactivating Protein*, HeLa cells

PENDAHULUAN

Jatropha curcas L merupakan tanaman tropis yang banyak terdapat di Indonesia, banyak dijumpai di daerah pantai. Selama ini pemanfaatan tanaman tersebut hanya sebagai tanaman pagar. Dalam rangka eksplorasi tanaman yang mengandung *Ribosome-inactivating protein* (RIP) yang berpotensi dikembangkan menjadi antikanker, telah dilakukan uji awal untuk mengetahui aktivitas khas RIP, yaitu aktivitas pemotongan DNA superkoil. Dari uji awal tersebut terlihat bahwa ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L menunjukkan aktivitas protein khas RIP. Adapun RIP adalah protein yang terdistribusi luas pada tanaman. Protein tersebut mampu menghambat sintesis protein karena aktivitas RNA N-glikosidasenya, dengan memotong ikatan glikosidik adenin tertentu pada 28S rRNA (26S rRNA khamir). Pemotongan ini mencegah pengikatan faktor perpanjangan 2 (EF-2) pada ribosom sehingga sintesis protein berhenti (Chaddock *dkk.*, 1996). Selain aktivitas N-glikosidase, RIP juga mempunyai aktivitas memotong DNA plasmid superkoil dan sirkuler secara *in vitro* (Roncuzzi dan Gasperi-Campadin, 1996).

Beberapa tanaman yang mengandung RIP, sudah diteliti lebih jauh dan dibuktikan mempunyai efek sitotoksik pada sel kanker. Diantara tanaman tersebut adalah srikaya (*Annona squamosa* L) dan bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa* L) (Hussaana, 1997; Sismindari *dkk.*, 2000; Ikawati *dkk.*, 2002). Kenyataan tersebut mendorong dugaan adanya efek sitotoksik dan potensi sebagai antikanker pada biji *Jatropha curcas* L, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengeksplorasi potensi anti kanker dari protein biji *Jatropha curcas* L. Pada penelitian awal ini akan dilakukan uji aktivitas pemotongan DNA superkoil *in vitro*, penentuan berat molekul protein serta uji efek induksi apoptosis dari protein biji *Jatropha curcas* L.

METODE PENELITIAN

Pembuatan ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L (EPBJ)

Biji *Jatropha curcas* L diperoleh dari buah yang sudah tua dari tanaman yang tumbuh di daerah pantai Samas, Bantul Yogyakarta. Biji segar dicuci bersih kemudian ditumbuk halus dengan penambahan 80 ml dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M natrium klorid pada suhu 4°C. Ekstrak yang diperoleh disentrifugasi dan diambil supernatannya. Supernatan ditambah ammonium sulfat

dengan kejenuhan 100 %. Larutan disentrifugasi, supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dalam sedikit mungkin dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2. Selanjutnya dilakukan dialisis dengan menggunakan dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2. Hasil dialisis disentrifugasi 8500 g selama 10 menit pada suhu 4 °C. Supernatan yang dihasilkan merupakan ekstrak protein (Stirpe dkk 1983) yang selanjutnya disebut ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L (EPBJ).

Uji Pemotongan DNA Superkoil

DNA superkoil diinkubasi dengan EPBJ dan bufer TMN (Tris-Magnesium-NaCl) selama satu jam pada suhu ruang, kemudian reaksi dihentikan dengan penambahan loading buffer. DNA kemudian *dirunning* pada elektroforesis gel agarosa 0,8 % (dengan etidium bromida) dalam bufer TBE (Tris-Borat-EDTA) selama 1 jam pada 50 Volt. Hasil diidentifikasi dengan sinar ultraviolet.

Penentuan Berat Molekul Protein

EPBJ ditetapkan ukuran protein dengan elektroforesis poliakrilamid – SDS (SDS-PAGE) kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan commasie blue (Sambrook *dkk.*, 1998).

Uji Apoptosis dari EPBJ dengan Metode Fragmentasi DNA (Kasagi, 1999)

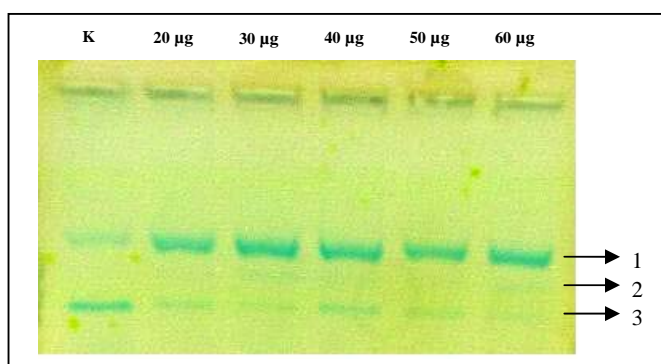
Sel kanker (sel HeLa) diinkubasi bersama EPBJ dengan dosis 0,109 µg/µl selama 24 jam. Selanjutnya DNA sel kanker diisolasi dengan mensuspensikannya dalam dapar lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 0,5 mM dan NaCl 100 mM) yang mengandung proteinase K dan Na dodesil sulfat 0,2% dan diinkubasi pada 37°C semalam. Preparat DNA diekstraksi dengan fenol:kloroform:isoamil alkohol (25:24:1) dan kemudian dengan kloroform:isoamil alkohol (24:1). RNase kemudian ditambahkan dilanjutkan inkubasi 37°C, 2 jam. Preparat DNA diekstraksi lagi dan diendapkan dengan etanol. Endapan dilarutkan dalam dapar TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 dan EDTA 1 mM). Hasil isolasi dielektroforesis pada gel agarosa 1%. DNA diwarnai dengan etidium bromida dan dideteksi dengan sinar UV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Pemotongan DNA Superkoil dari EPBJ

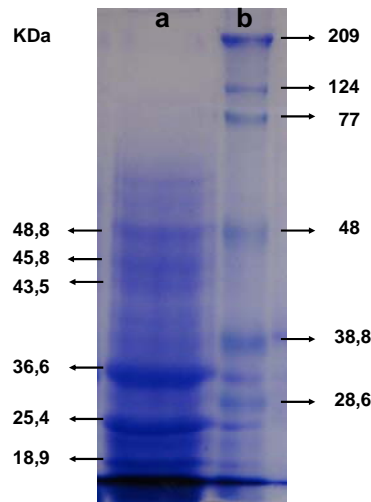
Dalam penelitian ini, biji *Jatropha curcas* L diperoleh dari biji yang sudah tua dari tanaman Jarak Pagar yang tumbuh di daerah pantai Samas, Bantul Yogyakarta. Protein dalam biji diendapkan seluruhnya dengan penambahan ammonium sulfat 100% jenuh dimaksudkan supaya tidak tercampur dengan senyawa non protein. Dalisis dilakukan untuk menghilangkan ammonium sulfat agar tidak mengganggu proses uji aktivitas. Rendemen yang diperoleh dari ekstraksi protein 50 mg biji *Jatropha curcas* L adalah sebanyak 2 ml ekstrak dengan kadar protein 10 mg/ml.

EPBJ yang diperoleh kemudian diuji aktivitas pemotongan DNA superkoil yang merupakan uji pengarah adanya kandungan *Ribosome-inactivating protein*. Dari uji tersebut dapat ditunjukkan bahwa EPBJ dengan kadar 20 – 60 µg mampu memotong DNA superkoil menjadi DNA *nick circular* dan DNA linier. Data disajikan pada **Gambar 1**. Pada gambar tersebut terlihat perbedaan antara lajur kontrol, yaitu DNA superkoil tanpa pemberian EPBJ dengan lajur-lajur yang mendapat EPBJ dengan dosis bertingkat dari 20 sampai 60 µg. Pada kontrol, pita DNA superkoil tebal, sedangkan yang mendapat EPBJ, pita DNA superkoil menipis sedangkan pita DNA *nick circular* menebal dan terbentuk pita DNA linier. Hasil tersebut menunjukkan bahwa EPBJ mempunyai protein dengan aktivitas *Ribosome-inactivating protein*. Dengan demikian EPBJ sangat mungkin menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel kanker.



Gambar 1. Elektroforegram gel agarosa hasil uji aktivitas pemotongan DNA superkoil dari protein biji Jarak Pagar. Pita 1, 2 dan 3 berturut-turut merupakan pita DNA *nick circular*, linier dan superkoil. Terlihat bahwa pada kontrol tanpa EPBJ, pita DNA superkoil tebal sedangkan pada pemberian EPBJ 20 – 60 µg, DNA superkoil menipis karena dipotong menjadi DNA *nick circular* dan DNA linier

Hasil elektroforesis SDS-PAGE dari EPBJ ditampilkan pada **Gambar 2**. Pada gambar 2 terlihat bahwa terdapat enam protein yang dominan dengan berat molekul 18,9; 25,4; 36,6; 43,5; 45,8; 48,8 KDa. Berat molekul di sekitar 30 KDa tersebut menunjukkan bahwa kemungkinan protein dalam EPBJ merupakan RIP tipe 1.

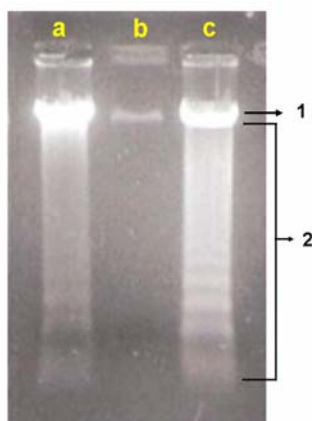


Gambar 2. Elektroforegram SDS-PAGE dari EPBJ. Terdapat enam pita protein yang dominan pada EPBJ, dengan berat molekul 18,9; 25,4; 36,6; 43,5; 45,8; 48,8 KDa.

Uji Apoptosis dari EPBJ dengan Metode Fragmentasi DNA (Kasagi, 2000)

Pada penelitian ini, uji apoptosis dilakukan dengan metode fragmentasi DNA (Kasagi, 2000), terhadap sel HeLa sebagai model sel kanker. DNA dari sel HeLa yang mendapatkan perlakuan dengan EPBJ maupun yang tidak, diisolasi dan dideteksi dengan elektroforesis gel agarosa untuk melihat apakah terjadi fragmentasi DNA. Fragmentasi DNA merupakan tanda khas pada proses apoptosis, yang terjadi karena pengaktifan caspase (terutama caspase-3) atau DFF45 (*DNA Fragmentation Factor-45*) oleh senyawa apoptotik yang kemudian diikuti oleh aktivasi endonuklease (Walker, 1999). Pengaktifan DFF45 terjadi dengan pemotongan pada residu D_{117} yang kemudian memacu aktivitas *DFF40 nuclease*, penyebab fragmentasi DNA (Sharif-Askari, 2001).

Gambar 3 menunjukkan terjadi fragmentasi DNA pada sel HeLa yang mendapat perlakuan dengan EPBJ, tetapi tidak pada sel HeLa yang tidak mendapat perlakuan dengan EPBJ. Hal ini membuktikan bahwa EPBJ memacu proses apoptosis.



Gambar 3. Elektroforegram gel agarosa hasil isolasi DNA sel HeLa. a. Sel HeLa yang diinkubasi dengan EPBJ 4 mg/ml b. Sel HeLa kontrol tanpa EPBJ. c. Sel HeLa yang diinkubasi dengan EPBJ yang dimurnikan, 4 mg/ml. Pada sel HeLa kontrol hanya terdapat pita 1 yaitu pita DNA kromosom sel HeLa, sedangkan pada inkubasi dengan EPBJ (a dan c) terjadi fragmentasi DNA (pita *smear* 2) karena DNA kromosom terpotong-potong menjadi banyak pita dengan berbagai ukuran, menandakan terjadinya apoptosis.

Adapun untuk mengetahui mekanisme yang memerantarai proses apoptosis, perlu dilakukan penelusuran selanjutnya dengan uji ekspresi p53 dan penelusuran jalur caspase.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L mempunyai aktivitas pemotongan DNA superkoil.
2. Berat molekul pada fraksi aktif ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L adalah 18,9; 25,4; 36,6; 43,5; 45,8 serta 48,8 KDa.
3. Ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L menunjukkan adanya efek induksi apoptosis, ditunjukkan dengan kemampuannya menyebabkan fragmentasi DNA sel HeLa.
4. Ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L mempunyai potensi anti kanker sebagai induktor apoptosis.

SARAN

1. Perlu uji sitotoksik dari ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L untuk mengetahui apakah hasilnya sejalan dengan hasil uji pemotongan DNA superkoil.

2. Perlu uji ekspresi p53, bax, bcl2 dan caspase-3 untuk menelusur mekanisme aksi kematian sel kanker karena pengaruh ekstrak protein biji *Jatropha curcas* L.

DAFTAR PUSTAKA

- Chaddock, J.A, Mozingo A.E , Robertus J.D , Lord J.M and Robert L.M. 1996. Major structural differences between pokeweed antiviral protein and ricin A-chain do not account for their differing ribosome specificity, *J. Biochem*, *235*. 159 – 166.
- Hussaana, A., 1997, Uji Aktivitas Pemotongan DNA Superkoil dari Ekstrak Protein Biji Srikaya (*Annona squamosa* L), data belum dipublikasi.
- Ikawati Z, Sudjadi, Sismindari , Sari R.P dan Maulani N. 2002. Efek fraksi sejenis RIP (*Ribosome inactivating protein*) yang diisolasi dari akar *Mirabilis Jalapa* L terhadap proses kematian sel HeLa dan sel Raji, *Biologi*, *2*, 769 – 783.
- Kasagi, N. 1999, Ethanol induces apoptosis in human gastric carcinoma cells: The role of apoptosis related molecules, *Yonago Acta Me*, *42*, 197 – 199
- Roncuzzi L and Gasperi – Campani A, 1996, DNA nuclease activity of the single chain ribosome inactivating proteins diathin 30, saporin 6 and gelonin. *FEBS Let*, *.392*.16 –20.
- Sambrook J, Fritsch E. F and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning* . A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sharif-Askari, E. *et al.*, 2001, Direct cleavage of the human DNA-fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation, *The EMBO Journal*, *20(12)* : 3101-3113
- Sismindari and Lord , J.M . 2000 . Ribosome-Inactivating Protein: RNA N-glycosidase activity of *Mirabilis Jalapa* L. *Morinda citrifolia* L and *Carica papaya* L, *Indon J. Biotech*, 324-345.
- Walker, P.R., Leblanc, J., Carson, C., Ribocco, M., and Sikorsa, M., 1999, Neither Caspase-3 or DNA Fragmentation Factor Is Required for High Molekular Weight DNA Degradation in Apoptosis, *Annals of NY Acad. Sci*. 887 : 48-59.