

AKTIVITAS PEMOTONGAN DNA SUPERKOIL OLEH FRAKSI-FRAKSI PROTEIN DAUN *Morinda citrifolia*

THE CLEAVING ACTIVITY ASSAY ON SUPERCOILED DNA BY PROTEIN FRACTIONS FROM *Morinda citrifolia* LEAVES

Nanik Sulistyani*, Sismindari** dan Sudjadi**

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

**Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

ABSTRAK

Uji aktivitas pemecahan terhadap DNA superkoil untai ganda oleh fraksi protein daun *Morinda citrifolia* telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan membandingkan aktivitas tiap fraksi protein berdasarkan kemampuan memotong DNA superkoil dalam upaya penapisan awal dan pencarian RIP (*Ribosome-Inactivating Protein*) dari daun tanaman *Morinda citrifolia*

Fraksinasi protein dilakukan dengan menambahkan amonium sulfat dengan kadar 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% untuk saturasi terhadap ekstrak gubal daun *Morinda citrifolia* dilanjutkan dengan sentrifugasi hingga diperoleh fraksi pengendapan F-20, F-40, F-60, F-80 dan F-100. Aktivitas pemotongan DNA superkoil dengan cara menginkubasi plasmid pUC19 dengan masing-masing fraksi pada kadar protein yang sama. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama satu jam.

Hasil menunjukkan bahwa protein yang paling besar kemampuan memotong DNA superkoil adalah fraksi F-80.

Kata kunci : *Ribosome-Inactivating Protein (RIP)*, DNA superkoil, fraksinasi, *Morinda citrifolia* L.

ABSTRACT

Study on supercoiled DNA cleaving activity assay of protein fraction from *Morinda citrifolia* leaf had been done. The aim of this research is to compare the supercoiled DNA cleaving abilities among the fractions. This is a preliminary screening to find RIP from *Morinda citrifolia*

Fractionation of protein was done by adding Ammonium Sulphate up to 20%, 40%, 60%, 80% and 100% in the crude extract, saturated solution was then centrifugated to get the pellet fractions and coded as F-20, F-40, F-60, F-80 and F-100. The mixture of pUC19 plasmid and protein fractions, in the same protein concentration were incubated at room temperature for one hour, the cleaving ability of protein fraction on supercoiled DNA was investigated.

The results indicated that protein fractions, of F-80 had the highest cleaving activity to supercoiled DNA.

Key words : *Ribosome-Inactivating Protein (RIP)*, supercoiled DNA, protein fraction, *Morinda citrifolia*.

PENDAHULUAN

Ribosome-Inactivating Protein (RIP) adalah sekelompok protein yang terdapat dalam tanaman tingkat tinggi dan mampu menghambat sintesis protein pada mamalia. RIP diketahui mempunyai aktivitas N-glikosidase, yaitu kemampuan memotong ikatan N-glikosidik antara ribosa dan adenin-4324 pada sub unit 28S rRNA mamalia (Endo dan Tsurugi, 1987; Citores dkk., 1993). Hal ini akan mengakibatkan berhentinya sintesis protein dan kemudian sel akan mati.

Berdasarkan strukturnya RIP diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu tipe pertama; berupa rantai tunggal dengan berat molekul 25-30 kD dan tipe ke dua berupa rantai ganda (A dan B) yang dihubungkan dengan ikatan disulfida dengan bobot molekul sekitar 60 kD. Pada RIP tipe 2, rantai B memiliki kemampuan

untuk berikatan dengan reseptor yang mengandung galaktosa pada permukaan sel sehingga memudahkan masuknya rantai A ke dalam sitoplasma dan menyebabkan inaktivasi ribosom. (Barbieri dkk., 1993).

RIP menarik untuk diteliti karena dari berbagai RIP yang telah ditemukan memiliki berbagai aktivitas seperti antiviral, abortifasien, immunosupresif dan aktivitas pemotongan DNA superkoil untai ganda. PAP (*Pokeweed antiviral protein*) dan diantin termasuk RIP yang mempunyai aktivitas anti viral pada beberapa tanaman dan hewan yaitu mampu menghambat replikasi virus mosaik pada daun tembakau (*Nicotiana*). PAP juga dilaporkan mampu menghambat replikasi virus influenza pada sel ginjal kera (Barbieri dkk., 1993). Aktivitas anti viral tersebut bersifat non spesifik, sebagai contoh PAP memiliki aktivitas terhadap tujuh kelompok virus yaitu virus DNA & RNA, virus polio, sitomegalovirus, virus influenza, virus herpes simpleks serta virus HIV pada sel manusia. Aksi penghambatan replikasi virus oleh PAP terjadi melalui penghambatan sintesis protein sel inang yang terinfeksi virus sehingga sel inang mati dan replikasi virus terhambat (Taylor dkk, 1994). GAP31 yang merupakan RIP dari *Gelonium multiflorum* mempunyai aktivitas anti HIV dengan cara menghambat enzim topoisomerase DNA dan aktivitas N-glikosidase rRNA (Leehuang dkk, 1994).

Aktivitas abortifasien dimiliki oleh beberapa RIP seperti trikosantin, gelonin, momordin, luffaculin dan saporin. Aktivitas ini terjadi karena adanya penurunan secara drastis kadar hormon *Human Chorionic Gonadotropin* (HCG) dan hormon-hormon steroid serta naiknya sintesis prostaglandin. Hal tersebut akan menginduksi terjadinya aborsi. Adapun momordin, gelonin dan trikosantin termasuk beberapa RIP yang memiliki aktivitas immunosupresif yaitu kemampuan memperlambat reaksi penolakan terhadap cangkok kulit (Barbieri dkk, 1993).

Aktivitas pemotongan DNA superkoil oleh RIP secara *in vitro* mula-mula ditemukan pada trikosantin yang merupakan RIP tipe pertama. Trikosantin mampu memotong DNA superkoil untai ganda menghasilkan DNA linier dan DNA *nicked circular* (Li dkk, 1991). RIP lain seperti ricin, luffin, cinnamomin dan camphorin secara *in vitro* menunjukkan aktivitas enzimatis memecah DNA superkoil untai ganda menjadi bentuk *nicked circular* pada kadar rendah dan menjadi bentuk linier pada kadar tinggi. RIP tipe dua yang dalam bentuk utuh tidak menunjukkan aktivitas N-glikosidase pada rRNA ternyata mampu memotong DNA superkoil (Ling dkk, 1994).

Berbagai RIP telah ditemukan pada lebih kurang 50 spesies tanaman dan antara lain dari suku Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Poaceae, Carriophyllales dan lain-lain. RIP dapat ditemukan dalam berbagai organ tanaman yaitu biji, daging buah, daun, akar, batang dan getah.

Para peneliti mulai tertarik terhadap RIP sejak diketahui bahwa RIP lebih toksik terhadap sel tumor dari pada sel normal. Hal ini menimbulkan harapan besar untuk memanfaatkan RIP sebagai anti kanker. Untuk mencapai tujuan tersebut, maka selektivitas RIP pada sel target perlu ditingkatkan. Hal ini bisa dilakukan dengan cara mengikatkan RIP pada suatu pembawa yang mampu secara spesifik mengenali sel target. Pembawa yang dipilih biasanya berupa antibodi monoklonal. Konjugasi RIP dengan antibodi dinamakan imunotoksin (Barbieri dkk, 1993).

RIP diduga terdapat dalam daun tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang secara tradisional digunakan untuk pengobatan kanker, berdasarkan identifikasi awal yang telah dilakukan oleh Wahyuaji dan Sismindari (1996). Identifikasi tersebut dilakukan dengan uji aktivitas pemotongan DNA superkoil dengan hasil antara lain ekstrak gubal daun pace memiliki kemampuan memotong DNA superkoil. Untuk melanjutkan penelitian tersebut, maka pada penelitian ini dilakukan penapisan awal dengan pemurnian parsial atau fraksinasi dan dilanjutkan dengan uji aktivitas pemotongan DNA superkoil untuk membandingkan aktivitas antar fraksi protein dan memperkirakan pada fraksi mana protein yang diduga sebagai RIP lebih banyak terendapkan.

METODOLOGI

Alat

Refrigerated centrifugation, bejana elektroforesis, tabung *conical*, mikropipet, alat-alat gelas, spektrometer uv.

Bahan penelitian.

Daun *M. citrifolia* (mengkudu), diambil di Jogyakarta bulan Januari 2001, dan telah diidentifikasi

oleh Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. *Escherichia coli* strain DH5 α , dan Plasmid pUC19 dari laboratorium Bioteknologi Universitas Gadjah Mada.

Bahan media Luria Bertani : Trypton 1% (b/v), dapar natrium fosfat, dapar MR (MOPS 5mM pH 7,2 ekstrak yeast 0,5% (b/v), larutan lisis I, larutan lisis II, larutan lisis III, larutan TE, agarosa dan dapar TBE, Semua bahan kimia yang digunakan bila tak disebutkan berasal dari E. Merck, natrium klorida 1% (b/v), ampisilin 100 μ g/ml volume akhir. Media padat dibuat dengan penambahan agar Oxoid 1,5%.

Bahan isolasi protein : (NaH₂PO₄ dan Na₂HPO₄) yang mengandung NaCl 0,14 M. Amonium sulfat untuk fraksinasi.

Bahan transformasi plasmid : 10 mM pH 7,0 dan rubidium klorida 10 mM dan Bufer MRC (MOPS 100 mM pH 6,5 dan kalsium klorida 50 mM).

Cara Penelitian

Preparasi DNA plasmid pUC19.

Preparasi diawali dengan pembuatan sel kompeten *E.coli* DH5 α dilanjutkan dengan transformasi DNA plasmid pUC19 pada *E.coli* tersebut. Selanjutnya isolasi DNA plasmid pUC19 dilakukan dengan metoda lisis alkali (Sambrook dkk, 1989).

Preparasi sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menggerus daun *M. citrifolia* pada tempat yang terpisah kemudian diekstraksi dengan natrium klorida 0,14M dalam dapar natrium fosfat 5mM pH 7,2. Setelah disentrifus pada suhu 4⁰C, supernatan diambil dan disebut sebagai ekstrak gubal. Ekstrak gubal difraksinasi atau diendapkan dengan penambahan amonium sulfat pada kadar berturut-turut 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% saturasi. Pada tiap tahap fraksinasi dilakukan sentrifugasi untuk mendapatkan endapan tiap-tiap fraksi dilanjutkan dengan dialisis dan diperoleh fraksi F-20, F-40, F-60, F-80 dan F-100.

Penetapan kadar protein

Kadar protein dalam sampel ditentukan dengan Spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 nm dan 260 nm (Roby dan White, 1987).

Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil

Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil (plasmid pUC19) oleh protein hasil fraksinasi dilakukan dengan menginkubasikan sejumlah DNA plasmid hasil isolasi dengan fraksi selama 1 jam pada suhu kamar. Fraksi protein yang diujikan mengandung protein dengan kadar yang sama. Identifikasi dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa dan sinar ultra violet.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak gubal hasil preparasi mengandung protein dengan kadar 34,4 mg/ml. Kadar tersebut dihitung berdasarkan harga serapan ultra violet oleh ekstrak gubal pada panjang gelombang 280 nm. Selain protein, asam nukleat yang memiliki panjang gelombang maksimum pada 260 nm, juga menyerap sinar ultra violet pada panjang gelombang 280 nm. Oleh karena itu, pada penetapan kadar protein dengan metode ini (Roby dan White, 1987), pengukuran harga serapan juga dilakukan pada panjang gelombang 260 nm untuk memperhitungkan faktor koreksi karena keberadaan asam nukleat dalam sampel.

Protein yang terdapat pada ekstrak gubal masih beragam, oleh karena itu diperlukan suatu penapisan dengan cara fraksinasi protein ekstrak gubal dengan harapan bahwa protein yang bertanggung jawab terhadap aktivitas pemotongan DNA superkoil akan lebih terkonsentrasi pada fraksi tertentu. Hal ini dapat diidentifikasi dengan membandingkan aktivitas antar fraksi.

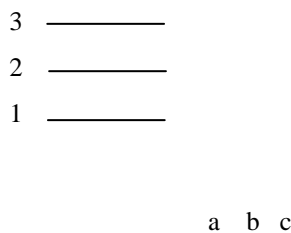
Fraksinasi protein dapat dilakukan dengan garam amonium sulfat. Metode ini dilakukan atas dasar peristiwa *salting out* yaitu semakin tinggi kadar garam dalam medium akan menurunkan kelarutan protein. Berkurangnya kelarutan akan menyebabkan terjadinya agregasi protein dan kemudian mengendap, sehingga mudah dipisahkan dengan sentrifugasi. Persentase amonium sulfat yang digunakan dihitung dari asumsi bahwa 100% saturasi sama dengan kadar amonium sulfat 4,05 M dan kelarutan amonium sulfat dalam larutan adalah 533 gram per liter.

Fraksinasi protein dalam ekstrak gubal diawali dengan penambahan amonium sulfat amonium sulfat hingga kadarnya mencapai 20% saturasi. Penambahan amonium sulfat ke dalam larutan harus sedikit demi sedikit dan disertai pengadukan terus-menerus. Endapan yang diperoleh setelah sentrifugasi merupakan

fraksi pengendapan 20% (disingkat F-20). Selanjutnya, supernatan yang diperoleh diendapkan lebih lanjut hingga diperoleh berturut-turut F-40, F-60, F-80 dan F-100. Fraksi-fraksi tersebut kemudian digunakan untuk uji aktivitas pemotongan DNA superkoil.

DNA superkoil diperoleh dengan melakukan transformasi pUC19 ke dalam *E. coli* DH5 α untuk tujuan penggandaan (amplifikasi). Adapun isolasi DNA plasmid pUC19 dilakukan dengan metode lisis alkali (Sambrook dkk, 1989). Hasil isolasi DNA plasmid diidentifikasi dengan elektroforesis gel agarosa dan akan menunjukkan adanya pita DNA *nick circular* dan DNA superkoil.

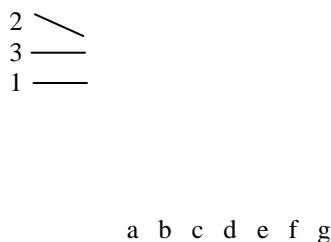
DNA superkoil bentuknya berpilin dan kompak sehingga migrasinya lebih cepat daripada DNA *nick circular* dalam elektroforesis. Pada elektroforegram DNA plasmid pUC19 sebagaimana tersaji dalam gambar 1 lajur a., selain kedua pita tersebut, muncul satu pita lain (pita ke-3) yang kemungkinan merupakan DNA kromosom yang belum terdenaturasi sehingga tidak mengendap dalam sentrifus dan ikut terekstraksi. Ukurannya jauh lebih besar dari pada plasmid sehingga migrasinya sangat lamban.



Gambar 1. Elektroforegram gel agarosa plasmid pUC19. (a) plasmid pUC19, terdapat 3 pita yaitu (1) pita plasmid bentuk superkoil, (2) bentuk *nick circular* dan (3) kontaminan kromosom *E. coli*, (b) pUC19 terdigesti oleh enzim *EcoR1*, (c) *marker* Lambda-*HindIII*.

Gambar 1. lajur b., merupakan pita DNA linier hasil pemotongan plasmid pUC19 oleh enzim *EcoR1* dan berukuran 2,7 kb dihitung berdasarkan elektroforegram *marker* Lambda-*HindIII* (lajur c) dengan cara memplotkan jarak migrasi DNA linier (hasil pemotongan) pada persamaan kurva regresi linier antar log ukuran DNA *marker* dan jarak migrasinya. Ukuran ini sesuai dengan peta restriksi dan panjang plasmid pUC19 yang memiliki satu sisi pengenalan untuk pemotongan oleh enzim *EcoR1* dengan ukuran hasil digesti 2,69 kb (Sambrook dkk, 1989).

DNA plasmid hasil isolasi tersebut selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas pemotongan DNA superkoil oleh ekstrak gubal dan fraksi-fraksi pengendapan (FP) yang dilakukan dengan cara menginkubasi plasmid pUC19 dan protein dengan jumlah masing-masing 2 μ g. Elektroforegram hasil uji tersebut ditampilkan pada gambar 2.



Gambar 2. Elektroforegram gel agarosa plasmid pUC19 hasil uji aktivitas protein fraksi pengendapan (F) terhadap DNA superkoil. (a) Kontrol (plasmid pUC19 tanpa pemberian ekstrak), (b) pUC19 setelah pemberian 2 μ g protein ekstrak gubal, (c) pUC19 setelah pemberian 2 μ g F-20, (d) F-40, (e) F-60, (f) F-80 dan (g) F-100. Aktivitas ditandai dengan penipisan pita (1) DNA superkoil, penebalan pita (2) DNA *nick circular* dan munculnya pita (3) DNA linier.

Hal yang dapat dianalisis dari gambar tersebut adalah bahwa di antara fraksi-fraksi pengendapan tersebut, F-20 (lajur c) memiliki aktivitas yang paling rendah untuk memotong DNA superkoil, sedangkan F-80 (lajur f) aktivitasnya paling besar. Pengamatan ini didasarkan pada pola penipisan pita DNA superkoil dan ketebalan pita DNA linier yang muncul. Adapun pita DNA *nick circular* tidak dijadikan sebagai parameter karena semua fraksi menunjukkan ukuran penebalan pita DNA *nick circular* yang hampir sama. Hal ini kemungkinan besar disebabkan karena hasil pemotongan DNA superkoil sebagian besar berupa DNA linier. Pada F-20 (lajur c), penipisan pita DNA superkoil sangat sedikit (hampir tidak kelihatan), demikian pula pita DNA linier tidak nampak sebagai pita yang jelas karena sangat tipis. Adapun pada F-80 (lajur f), pita DNA superkoil tampak sudah habis dan pita DNA linier yang muncul tampak paling tebal dibandingkan fraksi lain.

Tabel. 1. Tingkat Ketebalan Pita DNA Sebelum dan Sesudah Perlakuan Dengan Protein

DNA	Ketebalan Pita DNA						
	pUC19	CE	F-20	F-40	F-60	F-80	F-100
<i>Nick circular</i>	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
<i>Linier</i>	-	++	-	+	++	++++	+
Superkoil	++++++	+++	++++++	++++	+++	-	+

Catatan :

- pUC19 = kontrol plasmid (tanpa perlakuan)
- CE = perlakuan dengan ekstrak gubal
- F- = perlakuan dengan fraksi protein
- + = pita muncul dengan ketebalan tertentu
- = pita tidak muncul

Untuk memudahkan dan memperjelas analisis, perbandingan kualitatif tingkat aktivitas tiap-tiap fraksi tersebut dapat pula dirangkum sebagai tabel 1. Berdasarkan kriteria perbandingan yang telah ditetapkan, maka dapat dicermati bahwa urutan aktivitas pemotongan DNA superkoil dari yang paling rendah adalah F-20, F-40, F-60, F-100 dan yang paling aktif adalah F-80. Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa protein yang diduga sebagai RIP paling banyak diendapkan pada kadar kejenuhan amonium sulfat 80%.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

Ekstrak daun *M. citrifolia* mengandung protein dengan aktivitas mirip RIP terbesar yaitu aktivitas dapat diendapkan pada kejenuhan asam sulfat 80%, memotong DNA superkoil. Protein fraksi pengendapan 80% (F-80) mempunyai aktivitas terbesar dalam pemotongan DNA superkoil. Protein aktif dalam ekstrak daun *M. citrifolia* tersebut lebih banyak diendapkan pada kadar kejenuhan amonium sulfat 80%.

DAFTAR PUSTAKA

- Barbieri,L., Battelli,M.G., and Stirpe,F., 1993, Ribosome-Inactivating Proteins From Plants, *Biochem. et Biophys. Acta.*, 1154, 237-282.
- Citores,L., Ferraras,M.G., Iglesias,R., Carbajales,M.L., Aias,F.J., Jimenez,P., Rojo,M.A., and Gibres,T., 1993, Molekuler Mechanism of Inhibition Protein Synthesis by Some Four-Chain Agglutinins, Proposal Extended Classification of Plant Ribosome-Inactivating Protein (rRNA N-glycosidase), *FEBS*,329, 59-62.
- Endo,Y., and Tsurugi,K., 1987, RNA N-glycosidase Activity of Ricin A-chain. Mechanism of Action of the Toxic Lectin Ricin on Eucaryotic Ribosomes, *J. Biol. Chem.*, 262, 8128-8130.
- Leehuang,S., Kung,H.F., Huang,P.L., Bourinbaiar,A.S., Morell,J.L., Brown,J.H., Tsai,W.P., Chen,A.Y., Huang,H.I., and Chen,H.C., 1994, Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Inhibition, DNA Binding, and Ribosome Inactivation Activities in the N-terminal Segments of the Plant Anti HIV Protein GAP31, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12208-12212

- Li,M.X., Yeung,H.W., Pan,L.P., and Chan,S.I., 1991, Trichosanthin, a Potent HIV-1 Inhibitor, Can Cleave Supercoiled DNA *In Vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 19, 6309-6312.
- Ling,J., Liu,W., and Wang,T.P., 1994, Cleaved Supercoiled Double-Stranded DNA by Several Ribosome-Inactivating Protein *In Vitro*, *FEBS Letters*, 345, 143-146.
- Robyt, J.F. and White,B.J., 1987, *Biochemical Techniques, Theory and Practice*, Iowa State University, Brookes/Cole Publishing Co., Monterey, California, 256-271.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T., 1989, *Molecular Cloning : a Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Taylor,S., Massiah,A., Lomonosof,G., Roberts,LM., Lord,JM., and Hartley,M., 1994, Correlation Between The Activities of Five Ribosome-Inactivating Proteins in Depurination of Tobacco Mosaic Virus infection, *The Plant J.*, 5, 827-835.
- Wahyuaji,N.T. dan Sismindari, 1996, Aktivitas Pemotongan DNA Superkoil dari Ekstrak Tanaman *M. citrifolia* , *Skripsi*, Fakultas Farmasi Univ. Gadjah Mada, Yogyakarta.