

Identifikasi dan pengujian protein aktif mirip *Ribosome-inactivating protein* (RIPs) dalam *Kaemferia rotunda* Linn

Wiryatun-Lestariana¹, Sofia Mubarika², Sisindari³

¹Bagian Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Bagian Histologi dan Biologi Sel, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

³Bagian Biologi Molekuler Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Wiryatun Lestariana, Sofia Mubarika, Sisindari – *Identification and test of active protein resemble Ribosome-inactivating proteins (RIPs) on Kaemferia rotunda Linn*

Background: Statistically data of US Mortality showed that percentage cause of the death of the cancer is in second place after the heart diseases. Indonesia, Java especially Daerah Istimewa Yogyakarta, the data of The Dr. Sardjito hospital showed that the patients of cancer was increasing in the last year. Indonesian, especially Javanese, uses white turmeric to prevent and to treat cancer. There are some varieties of turmeric available commercially such as *Curcuma (C) mangga Val & Jipp*, *C. zeodaria* and *Kaemferia (K) rotunda* Linn. The studies showed that *C. mangga* contain proteins compound that resembles *Ribosome-inactivating proteins* (RIPs) which have activity to cleave supercoiled DNA. In vitro study indicated that the addition of crude extract of *C. mangga* on *cancer cell-lines* (B-LCL, EBV cells and Raji cell-lines) and normal lymphocytes, the percentage of cytotoxic effect on those cancer cell-lines were higher significantly than normal cells.

Objective: The aim of the study was to know the presence of RIPs activity in *K. rotunda* Linn by the ability of the RIPs in cleaving the supercoiled DNA.

Methods: The rhizomes of *K. rotunda* Linn that was in part dried at 40°C. Both wet and dried rhizomes are pounded and then extracted. The resulting crude extract was precipitated to obtain its protein fraction. The crude extract and protein with various concentrations were incubated with the supercoiled DNA and agarose gel electrophoresis was used to test its activity in cleaving the supercoiled DNA. The activity test was done by observing 3 criterions, viz. the thinning of the supercoiled DNA, the circular band thickening and the appearance of the linear band which were subsequently compared to the plasmid DNA without treatment.

Result: The results showed that both crude extracts and proteins of both wet and dried samples were able to cleave supercoiled DNA into circular and linear form. The increasing concentrations of the crude extract and the protein resulted in increasing the activity which was indicated by the thickening of circular band and the appearance of the linear band.

Conclusion: *Kaemferia rotunda* contains proteins compound that resemble *Ribosome-inactivating proteins* (RIPs) which have ability to cleave supercoiled DNA to be circular and linear DNA.

Key words: ribosome-inactivating proteins (RIPs) - supercoiled DNA - circular DNA - linear DNA - *Kaemferia rotunda* Linn

ABSTRAK

Wiryatun Lestariana, Sofia Mubarika, Sisindari – *Identifikasi dan pengujian protein aktif mirip Ribosome-inactivating protein (RIPs) dalam Kaemferia rotunda Linn*

Latar belakang penelitian: Data statistik *US Mortality* menunjukkan bahwa persentase kematian akibat penyakit kanker menduduki urutan ke dua setelah penyakit jantung. Di Indonesia, di Jawa khususnya Daerah Istimewa Yogyakarta, dari data R.S. Dr. Sardjito ditunjukkan bahwa penderita kanker beberapa tahun terakhir ini meningkat. Kunyit putih oleh masyarakat di Indonesia, khususnya Jawa, digunakan untuk pencegahan dan pengobatan kanker. Di pasaran dikenal berbagai kunyit putih atau empu putih, di antaranya ialah *Curcuma (C) mangga Val & V Jipp, C. zeodaria*, dan *Kaemferia (K) rotunda Linn*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *C. mangga* mengandung senyawa protein mirip *ribosome-inactivating proteins (RIPs)* yang mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil dan dari penelitian *in vitro* dengan *cancer cell - lines* (sel B-LCL EBV, Raji *cell-lines*) dan limfosit normal yang diberi *crude extract C. mangga* ditunjukkan bahwa persentase efek sitotoksik pada sel kanker lebih tinggi secara signifikan dibanding sel normal.

Tujuan penelitian: Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan protein mirip RIPs dalam (*K*) *rotunda Linn* dan kemampuan protein tersebut untuk memotong DNA superkoil.

Bahan dan cara penelitian: Sampel yang digunakan adalah rimpang *K. rotunda Linn*, yang sebagian dikeringkan 40°C. Baik sampel yang masih basah maupun yang sudah kering ditumbuk, kemudian diekstraksi. *Crude extract* yang diperoleh diendapkan untuk mendapatkan fraksi proteinnya. *Crude extract* dan protein dengan kadar yang bervariasi diinkubasikan bersama DNA plasmid (DNA superkoil) dan untuk mengetahui kemampuannya dalam pemotongan DNA superkoil menggunakan elektroforesis gel agarosa. Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil ditentukan dengan mengamati 3 kriteria, yaitu penipisan DNA superkoil, penebalan DNA sirkular dan terbentuknya DNA linear yang kemudian dibandingkan dengan DNA plasmid yang tanpa perlakuan.

Hasil penelitian: Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada kadar 0,1 mg/ml *crude extract* dan 0,1mg/ml protein baik dari sampel yang masih basah maupun sampel yang sudah dikeringkan mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil menjadi bentuk sirkular dan linear. Dengan meningkatnya kadar *crude extract* dan protein, makin meningkat pula aktivitasnya yang ditandai dengan terjadinya penebalan pita sirkular dan timbulnya pita linear yang semakin menebal.

Simpulan: *K. rotunda* mengandung protein aktif mirip RIPs dan mempunyai kemampuan memotong DNA superkoil menjadi DNA sirkular dan DNA linear.

(B.I.Ked. Vol. 35, No.4: 189-196, 2003)

PENGANTAR

Penyakit kanker, walaupun bukan merupakan penyebab kematian yang utama, tetapi masih merupakan beban yang berat baik bagi penderita maupun keluarga penderita. Data statistik *US Mortality* (2003) menunjukkan bahwa kematian karena penyakit kanker menduduki tempat ke dua setelah penyakit jantung¹. Dari data statistik *US Cancer Deaths* (2004) ditunjukkan bahwa pada laki-laki dan perempuan kematian yang disebabkan oleh kanker paru dan bronkus menunjukkan urutan yang tertinggi sedangkan urutan kedua pada laki-laki disebabkan oleh kanker prostat dan pada perempuan disebabkan oleh kanker payudara². Di Indonesia, kanker leher rahim dan kanker payu dara pada wanita serta kanker paru dan prostat pada laki-laki menduduki tempat yang tinggi³. Beberapa

tahun terakhir ini terdapat kecenderungan peningkatan penderita kanker *nasopharynx* pada usia muda dan produktif (data R.S. Dr. Sardjito, 2003: *unpublished*) yang secara luas berdampak negatif pada sosial-ekonomi. Hal ini disebabkan karena di samping biaya pengobatan yang mahal juga belum adanya obat yang menjamin penyembuhannya. Beberapa usaha pengobatan secara intensif telah dilakukan misalnya dengan pembedahan, penyinaran, maupun dengan obat sintetik, akan tetapi sampai dewasa ini belum didapatkan hasil yang betul-betul efektif. Hal ini disebabkan karena obat-obat kanker pada umumnya kurang selektif membedakan antara sel kanker dan sel normal. Untuk itu sangat perlu diupayakan penapisan obat-obat dari alam yang dapat digunakan sebagai pencegah maupun pengobatan kanker. Akhir-akhir ini kunyit putih menjadi perhatian

ABSTRAK

Wiryatun Lestariana, Sofia Mubarika, Sismindari – *Identifikasi dan pengujian protein aktif mirip Ribosome-inactivating protein (RIPs) dalam Kaemferia rotunda Linn*

Latar belakang penelitian: Data statistik *US Mortality* menunjukkan bahwa persentase kematian akibat penyakit kanker menduduki urutan ke dua setelah penyakit jantung. Di Indonesia, di Jawa khususnya Daerah Istimewa Yogyakarta, dari data R.S. Dr. Sardjito ditunjukkan bahwa penderita kanker beberapa tahun terakhir ini meningkat. Kunyit putih oleh masyarakat di Indonesia, khususnya Jawa, digunakan untuk pencegahan dan pengobatan kanker. Di pasaran dikenal berbagai kunyit putih atau empu putih, di antaranya ialah *Curcuma (C) mangga Val & V Jipp, C. zeodaria*, dan *Kaemferia (K) rotunda Linn*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *C. mangga* mengandung senyawa protein mirip *ribosome-inactivating proteins (RIPs)* yang mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil dan dari penelitian *in vitro* dengan *cancer cell - lines* (sel B-LCL EBV, Raji *cell-lines*) dan limfosit normal yang diberi *crude extract C. mangga* ditunjukkan bahwa persentase efek sitotoksik pada sel kanker lebih tinggi secara signifikan dibanding sel normal.

Tujuan penelitian: Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keberadaan protein mirip RIPs dalam (*K*) *rotunda Linn* dan kemampuan protein tersebut untuk memotong DNA superkoil.

Bahan dan cara penelitian: Sampel yang digunakan adalah rimpang *K. rotunda Linn*, yang sebagian dikeringkan 40°C. Baik sampel yang masih basah maupun yang sudah kering ditumbuk, kemudian diekstraksi. *Crude extract* yang diperoleh diendapkan untuk mendapatkan fraksi proteinnya. *Crude extract* dan protein dengan kadarnya yang bervariasi diinkubasikan bersama DNA plasmid (DNA superkoil) dan untuk mengetahui kemampuannya dalam pemotongan DNA superkoil menggunakan elektroforesis gel agarosa. Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil ditentukan dengan mengamati 3 kriteria, yaitu penipisan DNA superkoil, penebalan DNA sirkular dan terbentuknya DNA linear yang kemudian dibandingkan dengan DNA plasmid yang tanpa perlakuan.

Hasil penelitian: Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada kadar 0,1 mg/ml *crude extract* dan 0,1mg/ml protein baik dari sampel yang masih basah maupun sampel yang sudah dikeringkan mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil menjadi bentuk sirkular dan linear. Dengan meningkatnya kadar *crude extract* dan protein, makin meningkat pula aktivitasnya yang ditandai dengan terjadinya penebalan pita sirkular dan timbulnya pita linear yang semakin menebal.

Simpulan: *K. rotunda* mengandung protein aktif mirip RIPs dan mempunyai kemampuan memotong DNA superkoil menjadi DNA sirkular dan DNA linear.

(B.I.Ked. Vol. 35, No.4: 189-196, 2003)

PENGANTAR

Penyakit kanker, walaupun bukan merupakan penyebab kematian yang utama, tetapi masih merupakan beban yang berat baik bagi penderita maupun keluarga penderita. Data statistik *US Mortality* (2003) menunjukkan bahwa kematian karena penyakit kanker menduduki tempat ke dua setelah penyakit jantung¹. Dari data statistik *US Cancer Deaths* (2004) ditunjukkan bahwa pada laki-laki dan perempuan kematian yang disebabkan oleh kanker paru dan bronkus menunjukkan urutan yang tertinggi sedangkan urutan kedua pada laki-laki disebabkan oleh kanker prostat dan pada perempuan disebabkan oleh kanker payudara². Di Indonesia, kanker leher rahim dan kanker payu dara pada wanita serta kanker paru dan prostat pada laki-laki menduduki tempat yang tinggi³. Beberapa

tahun terakhir ini terdapat kecenderungan peningkatan penderita kanker *nasopharynx* pada usia muda dan produktif (data R.S. Dr. Sardjito, 2003: *unpublished*) yang secara luas berdampak negatif pada sosial-ekonomi. Hal ini disebabkan karena di samping biaya pengobatan yang mahal juga belum adanya obat yang menjamin penyembuhannya. Beberapa usaha pengobatan secara intensif telah dilakukan misalnya dengan pembedahan, penyinaran, maupun dengan obat sintetik, akan tetapi sampai dewasa ini belum didapatkan hasil yang betul-betul efektif. Hal ini disebabkan karena obat-obat kanker pada umumnya kurang selektif membedakan antara sel kanker dan sel normal. Untuk itu sangat perlu diupayakan penapisan obat-obat dari alam yang dapat digunakan sebagai pencegah maupun pengobatan kanker. Akhir-akhir ini kunyit putih menjadi perhatian

bufer TMN. Campuran tersebut diinkubasikan dengan sejumlah *crude extract* dengan berbagai kadar (5 ml). Inkubasi dilakukan pada suhu kamar (30°C) selama 1 jam. Pada akhir reaksi ditambahkan 3 ml bufer pemuat, kemudian dilakukan elektroforesis pada gel agarosa (yang sudah mengandung pewarna etidium bromida) dengan menggunakan bufer TBE. Elektroforesis dilakukan pada 80 volt selama 90 menit. Identifikasi dilakukan dengan sinar ultra violet. Uji juga dilakukan pada DNA plasmid yang didigesti dengan enzim restriksi (EcoRI) sehingga diperoleh pita linear dan pada marker DNA diperoleh 3 pita sebagai kontrol.

Analisis hasil

Uji aktivitas protein mirip RIPs ditentukan dengan mengamati tiga kriteria, yakni penipisan pita DNA superkoil, penebalan pita DNA sirkular terbuka dan terbentuknya pita linear, dengan pembandingan DNA plasmid utuh tanpa perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman

Dari hasil pemeriksaan determinasi tanaman yang dilakukan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, ditunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah betul *Kaemferia rotunda* Linn.

2. Pemurnian protein aktif (RIPs)

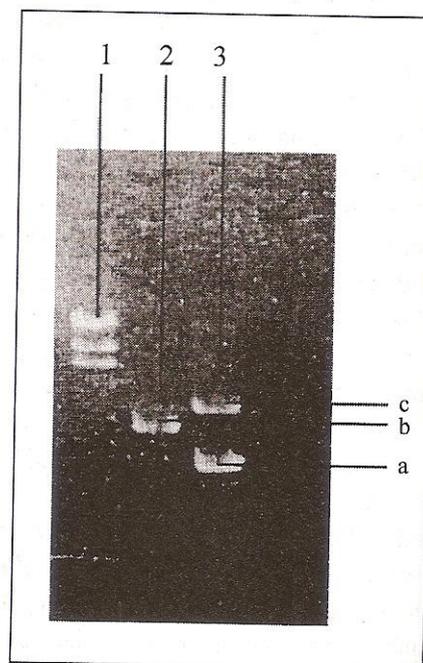
Dari 30 gram sampel basah diperoleh 6 mg protein total (2 % b/b) sedangkan dari 10 gram sampel kering diperoleh 1,5 mg protein total (1,5 % b/b).

3. Isolasi dan pemurnian pUC19

Isolasi DNA plasmid yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa untuk melihat kualitas isolasi. Dari elektroforegram (GAMBAR 1) ditunjukkan bahwa marker DNA terlihat 3 pita (lajur 1), DNA plasmid pUC19 yang didigesti dengan enzim restriksi terlihat 1 pita linear (lajur 2, pita b) dan pada DNA plasmid utuh terlihat 2 pita (jalur 3, pita a) yaitu pita yang bermigrasi paling jauh dan mempunyai intensitas yang tinggi merupakan DNA superkoil sedang pita yang bermigrasi lebih lambat (jalur 3, pita c) merupakan bentuk sirkular terbuka.

4. Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil

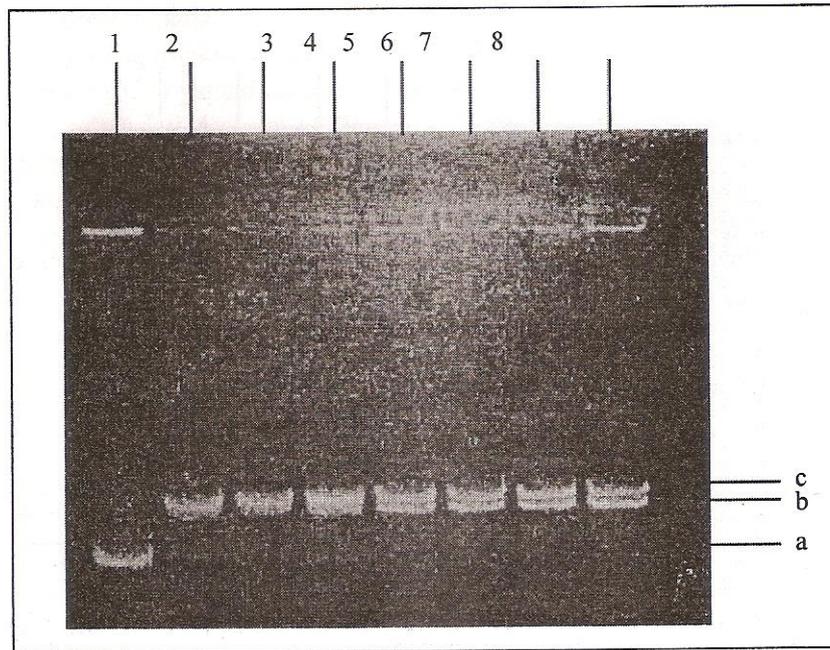
Hasil uji aktivitas *crude extract* basah yang dengan menggunakan 1mg DNA pUC19 yang diinkubasi dengan satu seri ekstrak *K. rotunda* basah dengan kadar 0mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/ml, ditunjukkan pada GAMBAR 2. Hasil uji aktivitas *crude extract* *K. rotunda* kering yang dilakukan dengan menggunakan 1 mg DNA pUC19 yang diinkubasikan dengan satu seri kadar *crude extract* yaitu 0 mg/ml; ; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/ml ditunjukkan pada GAMBAR 3.



GAMBAR 1. Elektroforegram gel agarosa DNA plasmid pUC19

Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan 0,8% agarosa dengan bufer TBEIX pada 70V selama 1,5 jam
Lajur : 1. DNA marker *IHindIII* 2. DNA plasmid pUC19 linier 3. DNA plasmid pUC19 utuh
(a) pita plasmid pUC19superkoil (b) pita plasmid pUC19 linier (c) pita plasmid pUC19 sirkular

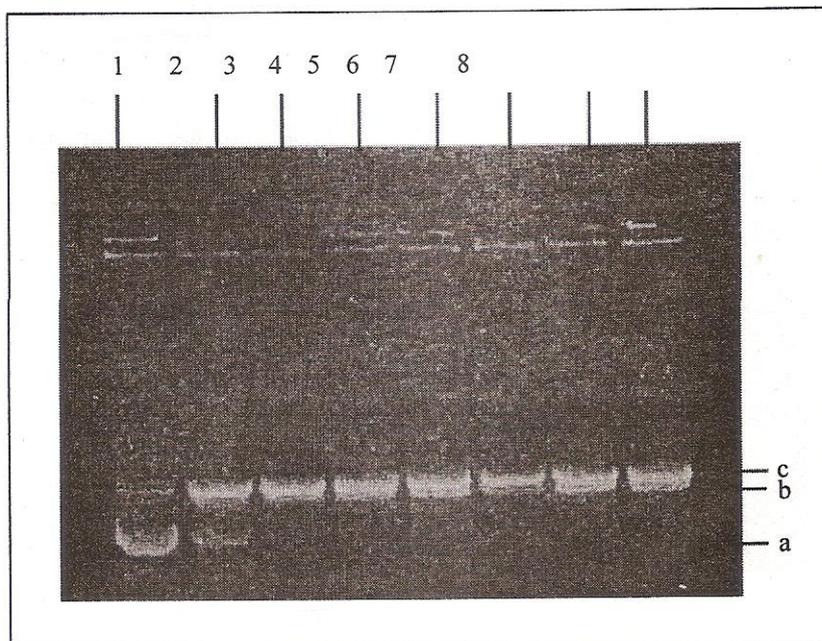
Aktivitas fraksi protein dari *crude extract* *K. rotunda* basah yang dilakukan dengan menggunakan 1 mg DNA pUC19 yang diinkubasikan dengan satu seri kadar protein 0,1mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/m ditunjukkan pada GAMBAR 4.



GAMBAR 2. Elektforegram hasil uji aktivitas *crude extract* *K rotunda* basah
Uji aktivitas *crude extract* dilakukan dengan menggunakan 1mg DNA pUC19 yang diinkubasikan dengan satu seri kadar *crude extract*.

Lajur 1: tanpa ekstrak 2 s/d 8 dengan *crude extract* pada kadar berturut-turut 0,1 mg/ml; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml; 0,7 mg/ml

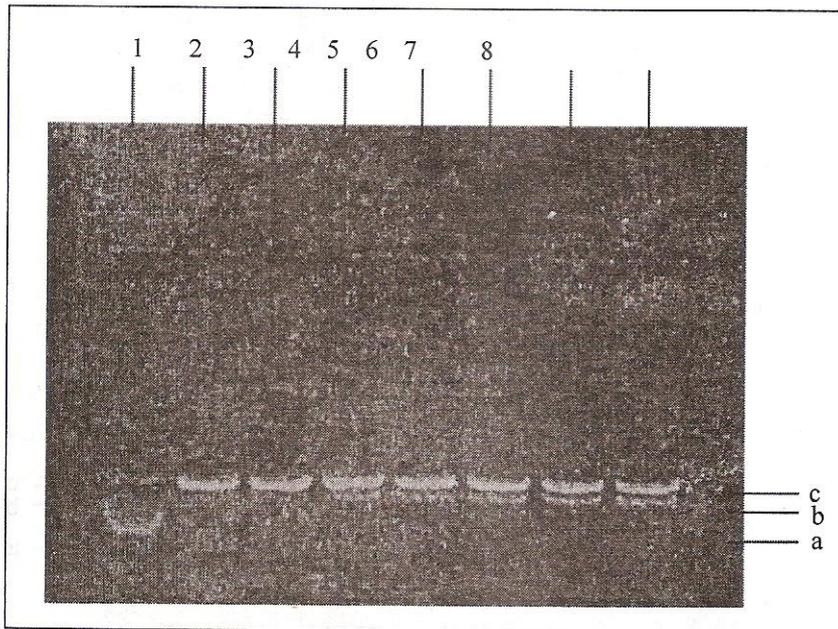
Pita a: pita bentuk superkoil Pita b: pita bentuk linier Pita c: pita bentuk sirkuler



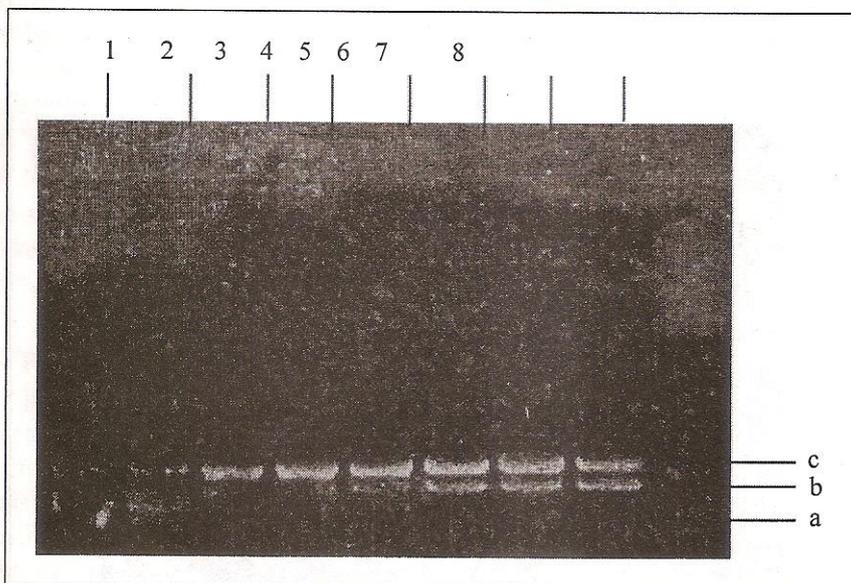
GAMBAR 3. Elektforegram hasil uji aktivitas *crude extract* *K rotunda* kering
Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan 1mg DNA pUC19 yang diinkubasikan dengan satu seri kadar *crude extract*.

Lajur 1: tanpa ekstrak Lajur 2 s/d 8 ; dengan kadar ekstrak berturut-turut: 0,1 mg/ml ; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/ml

Pita a: pita bentuk superkoil Pita b: pita bentuk linier Pita c: pita bentuk sirkuler



GAMBAR 4. Elektroforegram hasil uji aktivitas fraksi protein *K. rotunda* basah
Uji aktivitas dilakukan dengan menggunakan 1mg DNA pUC19 yang diinkubasikan dengan satu seri kadar protein
Lajur 1: tanpa protein Lajur 2 s/d 8 ; dengan kadar ekstrak berturut-turut: 0,1mg/ml ;
0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/ml
Pita a: pita bentuk superkoil Pita b: pita bentuk linier Pita c: pita bentuk sirkuler



GAMBAR 5. Elektroforegram hasil uji aktivitas fraksi protein *K. rotunda* kering
Uji aktivitas fraksi protein yang dilakukan dengan menggunakan 1mg DNA pUC19 yang diinkubasikan
dengan satu seri kadar fraksi protein.
Lajur 1: tanpa protein Lajur 2 s/d 8 ; dengan kadar protein berturut-turut: 0,1mg/ml ; 0,2 mg/ml; 0,3 mg/ml; 0,4 mg/ml; 0,4 mg/
ml; 0,5 mg/ml; 0,6 mg/ml dan 0,7 mg/ml
Pita a: pita bentuk superkoil Pita b: pita bentuk linier Pita c: pita bentuk sirkuler

Sedan
extrac
mengg
denga
mg/ml
mg/m
GAM
P
plasm
gel ag
(lajur
Untuk
pUC1
enzim
penge
dalam
superk
diperc
(jalur
2,71 k
untuk
aktivit
penge
U
tunda
hasil y
DNA
peneb
serta t
bertan
pita b
sampe
mg /m
cukup
sebagi
muncu
Pada
terben
H
kering
ekstra
sampe
bahwa
ml DN
dibane
(GAM
yang s
pita b)

Sedangkan uji aktivitas protein pada fraksi *crude extract* *K. rotunda* kering yang dilakukan dengan menggunakan 1 mg DNA pUC19 yang diinkubasi dengan satu seri kadar protein 0,025 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,075 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,125 mg/ml; 0,150 mg/ml; dan 0,175 mg/ml ditunjukkan pada GAMBAR 5.

Pada GAMBAR 1 ditunjukkan bahwa DNA plasmid pUC19 hasil isolasi, dengan elektroforesis gel agarosa menunjukkan 2 pita yaitu pita superkoil (lajur 3 pita a) dan sirkular terbuka (jalur 3, pita c). Untuk menentukan kebenaran ukuran plasmid pUC19, plasmid tersebut setelah didigesti dengan enzim restriksi yang hanya mempunyai satu sisi pengenalan yaitu *EcoRI* diperoleh pita linear, yang dalam gel agarosa bermigrasi di antara pita superkoil dan pita sirkular terbuka⁹ Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pita linear pUC19 (jalur 2, pita b) tersebut mempunyai ukuran sekitar 2,71 kb. Dengan demikian hasil isolasi DNA ini untuk selanjutnya dapat digunakan untuk uji aktivitas *crude extract* dan uji fraksi protein hasil pengendapan.

Uji aktivitas ekstrak baik dari rimpang *K. rotunda* basah maupun rimpang kering menunjukkan hasil yang positif yaitu terjadinya penipisan pita DNA superkoil (GAMBAR 2 dan 3, pita c) dan penebalan pita sirkuler (GAMBAR 2 dan 3, pita c) serta timbulnya pita linear yang makin tebal dengan bertambahnya kadar ekstrak (GAMBAR 2 dan 3, pita b). GAMBAR 2, hasil uji aktivitas ekstrak sampel basah menunjukkan bahwa pada kadar 0,1 mg /ml (lajur 2) telah mempunyai aktivitas yang cukup tinggi yang ditandai dengan hilangnya sebagian besar pita superkoil (lajur 2, pita a) dan muncul pita sirkular (pita c) dan pita linear (pita b). Pada kadar ekstrak 0,7 mg /ml pita linear yang terbentuk sangat jelas.

Hasil uji aktivitas *crude extract* dari sampel kering (GAMBAR 3) menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak sedikit lebih rendah dibanding ekstrak dari sampel basah. Pada GAMBAR 3, lajur 2 ditunjukkan bahwa kadar ekstrak sampel kering kadar 0,1 mg / ml DNA superkoil (pita a) masih terlihat lebih tebal dibanding pita superkoil ekstrak sampel basah (GAMBAR 2, lajur 2, pita a) dengan kadar ekstrak yang sama. Juga pita linear (GAMBAR 3, lajur 2, pita b) muncul lebih tipis. Hal ini kemungkinan besar

disebabkan karena adanya protein aktif yang mengalami kerusakan selama proses pengeringan sampel pada suhu 40°C.

Uji aktivitas fraksi protein sampel rimpang basah (GAMBAR 4) juga menunjukkan hasil yang serupa dengan hasil uji *crude extract* sampel basah (GAMBAR 2). Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan besar senyawa yang aktif adalah dalam bentuk protein. Jika terdapat senyawa lain yang aktif memotong DNA, maka aktivitas fraksi protein menjadi menurun. Pada uji aktivitas dengan menggunakan kadar protein 0,1 mg /ml, pita DNA superkoil yang tertinggal terlihat sangat tipis. Oleh karena itu, pada uji selanjutnya digunakan rentang kadar protein yang lebih sempit yakni mulai dari 0,025 mg /ml s/d 0,175 mg /ml dengan interval 0,025 mg /ml (GAMBAR 5). Hasilnya menunjukkan bahwa pada fraksi protein sampel kering dengan kadar 0,025 mg /ml telah terlihat aktif seperti yang ditunjukkan dengan menebalnya pita sirkular (GAMBAR 5, lajur 2, pita c). Dari semua uji aktivitas baik dari *crude extract* dan fraksi protein sampel basah maupun *crude extract* dan protein sampel kering, dengan bertambahnya kadar terjadi kenaikan aktivitas yang ditandai dengan terjadinya penebalan pita sirkular dan munculnya pita linear yang semakin tebal (GAMBAR 2,3,4,5, pita c dan b). Adanya aktivitas memotong DNA superkoil itu menunjukkan bahwa ekstrak tanaman tersebut mengandung protein aktif yang mirip RIP. *Trichosanthin* yang diisolasi dari *Trichosanthes kirilowi* merupakan RIP pertama yang diketahui mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil¹³. Kemampuan memotong DNA superkoil dimiliki baik oleh RIP tipe I maupun RIP tipe II, misalnya risin yang diisolasi dari *Ricinus communis*, sehingga aktivitas ini kemudian digunakan sebagai penapisan awal keberadaan RIP¹³.

Beberapa senyawa misalnya ekstrak daun *Mirabilis jalapa*, *Morinda citrifolia*, *Carica papaya* dan *C. mangga* yang telah diuji mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil terbukti juga mempunyai efek N-glikosidase RNA, yakni efek yang mampu memotong rantai glikosidik RNA dari eukariot^{3,14}. Ekstrak tersebut juga terbukti mampu menghambat proliferasi kultur sel B-LCL-EBV dan *Raji cell-lines* secara selektif⁹.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat diambil simpulan bahwa rimpang *Kaemferia rotunda* Linn mengandung protein aktif yang mempunyai aktivitas mirip *Ribosome-inactivating Proteins* (RIPs). Kadar protein total 0,1 mg/ml baik *crude extract* dan fraksi protein dari sampel basah maupun sampel kering telah mampu memotong 0,1 mg DNA superkoil menjadi bentuk sirkular. Dengan meningkatnya kadar ekstrak dan protein juga terjadi peningkatan aktivitas pemotongan DNA superkoil yang ditandai dengan terjadinya penebalan pita sirkular dan munculnya pita linear yang semakin menebal.

Saran

Untuk konfirmasi, efek protein dalam *Kaemferia rotunda* Linn yang telah terbukti mirip RIPs tersebut perlu diujikan terhadap RNA ribosomal maupun terhadap berbagai kultur sel kanker secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Dasar Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional atas bantuan penelitian ini dan juga pada Laboratorium Hayati UGM atas fasilitas laboratorium yang telah diberikan.

KEPUSTAKAAN

1. Anonymous. Us Mortality Public Use Data Tape 2001. National Center for Health Statistics, Center for Disease Control and Prevention. 2003. <http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr52//nvsr52-03-.pdf> diambil tg 11.02.04
2. Sarah Haase. 2004 Estimated US Cancer Deaths. American Cancer Society, 2004. <http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr52//nvsr52-03-.pdf> diambil tg 11.02.04
3. Soeripto. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. B Ked Mas (Ina), 1998; XIII: 207-11
4. Wiryatun Lestariana, Hapsari Triandriyani, Sismindari, Sofia Mubarika. Identifikasi protein aktif dalam Curcuma mangga dan uji aktivitasnya pada DNA superkoil. Buletin ISFI Yogyakarta, 2000; 3(1): 25-30.
5. Endo Y., and Tsurugi K. RNA-N-glycosidase activity of ricin A - chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukariotic ribosomes. J Biol Chem 1987; 262: 8128 - 30
6. Barbieri L. Baltelli MG. Ribosome-Inactivating protein from plants, Biochem Biophys. Acta. 1993; 1154: 237-82
7. Wiryatun L, Mubarika S. Sismindari. Identifikasi dan pengujian protein aktif sebagai antikanker dalam kunir putih (curcuma mangga). Laporan Penelitian 1999; Proyek QUE UGM/ Batch I No.UGM/KU/424/ QUE/V/99, Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta
8. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989,USA.
9. Old RW and Primrose SB. Principle of Gene Manipulation, 4th edition. London: Blackwell Scientific publication, 1989: 3-12
10. Stripe F, Gaspari-Campani A, Barbieri L, Abbondanza A, Stevens WA. Ribosome - Inactivating Proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Argositemma githago* L. (corn cocle) and *Asparagus officinalis* L. (aspargus) and from the Latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree), Biochem J. 1983; 216: 617 - 25
11. Scopes RK. Protein purification, Principles and practice 2nd Ed. New York: Spring - verlag, 1987: 41 -64
12. Sismindari, Purnamawati D, Suprapti E, dan Wahyuaji NT. Identifikasi Ribosome-Inactivating Proteins (RIP'S) pada ekstrak dari daun *Gynura procumbens*, biji *Carica papaya*, daun *Myrabilis yalapa* L, dan biji *Morinda citrifolia* L dengan uji pemotongan DNA superkoil untai ganda, Seminar Ilmiah dalam Lustrum dan Reuni Fakultas Farmasi UGM, 1996. Yogyakarta
13. Li MX, Yeung HW, Pan LP, Chan SI. Trichosanthin, a potent HIV-1 inhibitor, can cleave supercoil DNA in vitro. Nucleic acids Res. 1991; 19: 6309 - 12.
14. Ling J, Liu W, Wang TP. Cleavage of supercoiled double stranded DNA by several ribosome - Inactivating Proteins in vitro, FEBS Letters, 1994; 345: 143-345.