

## ABSTRAK

# MEKANISME SITOTOKSISITAS PROTEIN RICIN DARI BIJI JARAK (*Ricinus communis* L.) TERHADAP SEL KANKER PARU-PARU A549 SECARA *IN SILICO* DAN *IN VITRO*

Oleh  
**IRMA ERIKA HERAWATI**  
**NPM: 260130190042**

Kanker paru-paru merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia. Terapi kanker dapat dilakukan dengan menghambat atau membunuh sel kanker dan perkembangannya melalui apoptosis (program kematian sel) yang dapat diamati secara *in vitro*. Obat antikanker yang sekarang banyak digunakan secara klinis terbukti memiliki sifat sitotoksik dan dapat menyebabkan kematian secara apoptosis. Saat ini tidak sedikit hasil penelitian yang menunjukkan bahwa bahan alam dan metabolit sekundernya memiliki aktivitas antikanker yang dapat menghambat proliferasi dan menginduksi apoptosis pada berbagai jenis sel kanker. Salah satu tanaman toksik yang memiliki potensi antikanker dan masih membutuhkan eksplorasi lebih lanjut terhadap sel kanker paru-paru adalah tanaman jarak (*Ricinus communis* L.) yang termasuk ke dalam keluarga Euphorbiaceae.

Jarak merupakan tanaman tropis yang banyak ditanam di Jawa Timur, Indonesia. Daun dan biji tanaman ini telah digunakan secara tradisional untuk menyembuhkan penyakit hati, gangguan lambung, peradangan, demam, sakit kepala, dll. Ricin, zat beracun yang diisolasi dari biji jarak, adalah protein polipeptida heterodimer yang mencakup rantai A (30 kDa) dan rantai B (35 kDa) dihubungkan oleh ikatan disulfida. Menariknya, beberapa penelitian mengungkapkan bahwa ricin memiliki sifat sitotoksitas terhadap berbagai sel kanker.

Dalam penelitian ini, protein ricin yang diekstraksi dari biji jarak diidentifikasi dengan menggunakan (1) *liquid chromatography* (LC); (2) *column liquid chromatography* (CLC); dan (3) *fast protein liquid chromatography* (FPLC), diikuti oleh *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE). *Crude ricin* (CR) diteliti untuk diketahui sitotoksitasnya pada sel kanker paru-paru A549 dengan uji *Presto Blue*, dieksplorasi pengaruhnya pada proses apoptosis menggunakan *flow cytometry* dan *Western blot*, kemudian kemampuan migrasi selnya diukur dan dieksplorasi pengaruhnya dalam proses autofagi dengan *Western blot*. Selain itu, dilakukan juga studi *in silico* untuk menelaah ikatan yang terjadi antara ricin rantai A terhadap protein-protein yang berperan pada tahap apoptosis (caspase-3, -8, dan -9) dan protein-protein yang berperan pada setiap

tahap proses autofagi (Beclin-1, ATG5, LC3 atau *Light Chain 3*, dan p62/*Sequestosome1*). Struktur kristal sinar-X dari caspase-3, -8, -9, Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62 diunduh dari <https://www.rcsb.org/structure/>. *Docking* protein-protein dilakukan dengan menggunakan *server online* ClusPro (<https://cluspro.org/>).

Identifikasi CR menunjukkan bahwa semua teknik kromatografi yang digunakan secara positif mengkonfirmasi keberadaan protein ricin. Adanya protein ricin ditunjukkan dengan puncak doublet ricin rantai A dan rantai B pada semua kromatogram. Hasil elektroferogram SDS-PAGE membuktikan bahwa protein ricin dapat teridentifikasi pada BM 35 kDa. Dari hasil elektroferogram, metode CLC ternyata dapat memisahkan dua protein pada BM 33 kDa (ricin rantai A) dan 36 kDa (ricin rantai B), sementara metode FPLC hanya dapat mengekspresikan satu protein 35 kDa.

Hasil studi *in silico* menyatakan bahwa ricin rantai A memiliki mode pengikatan yang serupa dengan Ac-DEVD-AFC (substrat caspase-3) yaitu ikatan hidrogen (Ser205, Arg207, Ser209) dan interaksi hidrofobik (Trp206 dan Phe256). Ricin rantai A berinteraksi dengan Arg413 dan Ser411 yang terletak antiparalel di kantong pengikat caspase-8. Sebagian ricin rantai A juga berikatan dengan Val410, residu yang terletak di kantong S2 caspase-8. Selain itu, ricin rantai A berinteraksi dengan beberapa residu asam amino di caspase-9. Sementara hasil *docking* ricin rantai A dengan protein-protein autofagi, menunjukkan bahwa ricin rantai A dapat berinteraksi dengan Beclin-1, ATG5, LC3, dan p62 melalui pembentukan ikatan hidrogen pada residu-residu asam amino.

Hasil pengujian secara *in vitro* membuktikan bahwa CR memiliki sitotoksitas terhadap sel kanker paru-paru A549 dengan nilai  $IC_{50}$  40,94 ppm, lebih tinggi dibandingkan cisplatin yang memiliki  $IC_{50}$  10,98 ppm. Hal ini mengindikasikan bahwa sitotoksitas CR terhadap sel kanker paru-paru A549 lebih rendah dari pada cisplatin. Analisis *flow cytometry* mengidentifikasi bahwa kematian sel oleh CR disebabkan oleh apoptosis serta nekrosis, tetapi apoptosis terjadi lebih sering daripada nekrosis, yang menunjukkan bahwa CR lebih kuat dalam menginduksi apoptosis daripada nekrosis. Terjadinya apoptosis kemungkinan lebih cepat karena sebagian besar sel mengalami apoptosis pada fase awal. Pengujian apoptosis dengan metode *Western blot* memperlihatkan bahwa CR dapat menginduksi apoptosis melalui aktivasi caspase-9 dan caspase-3, yang ditandai oleh peningkatan ekspresi kedua protein apoptosis tersebut. Pada pengujian migrasi sel, CR dan cisplatin menghambat migrasi sel secara signifikan yang bergantung pada konsentrasi dan waktu, dan efek tertingginya diberikan oleh konsentrasi 1,0 ppm dengan penutupan celah masing-masing 3,10 dan 3,28% dalam inkubasi 48 jam. Pengujian aktivitas autofagi mengindikasikan bahwa CR dapat menurunkan kadar Beclin-1 dan meningkatkan kadar ATG5, serta menurunkan kadar LC3-II dan

meningkatkan kadar p62. Beclin-1 merupakan komponen penting untuk langkah nukleasi fagofor autofagi, sedangkan ATG5 adalah protein yang sangat diperlukan untuk membentuk autofagosom. LC3-II dikenal sebagai satu-satunya biomarker protein yang secara andal terkait dengan pembentukan autofagosom dan pematangan, dan p62 adalah protein pengikat yang berfungsi sebagai penghubung antara LC3 dan substrat autofagi. Hal ini membuktikan bahwa CR dapat menghambat autofagi pada tahap awal di sel kanker paru-paru A549. Penghambatan autofagi juga ditunjukkan oleh cisplatin karena efeknya pada protein penanda autofagi sama dengan CR.

Berdasarkan hasil keseluruhan dari penelitian ini, CR memiliki potensi sebagai kandidat obat antikanker, tetapi penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengungkapkan profil aktivitas antikanker yang lebih lengkap.

**Kata kunci:** CR, sel kanker paru-paru A549, apoptosis, autofagi.

## ABSTRACT

### **CYTOTOXICITY MECHANISM OF CRUDE RICIN FROM *Ricinus communis* L. SEEDS IN A549 LUNG CANCER CELL LINE USING *IN SILICO* AND *IN VITRO***

**by:**

**IRMA ERIKA HERAWATI**

**NPM: 260130190042**

Lung cancer is one of the cancer types with the high mortality rate in the world. Available anticancer drugs for lung cancer stimulate the apoptosis process and caused cell death. However, current anticancer drugs that are widely used have been shown to exhibit side effects on the normal cells, are toxic, and induce apoptotic as well. Currently, many research results are showing that natural ingredients and their secondary metabolites have an anticancer activity that could inhibit proliferation and induce apoptosis in various types of cancer cells. Interestingly, it also showed less toxicity to normal cells. One of the toxic plants that have anticancer potential and still need further exploration to lung cancer is the castor plant (*Ricinus communis* L.) which belongs to the Euphorbiaceae family.

Castor is a tropical plant that is widely grown in East Java, Indonesia. The leaves and seeds of this plant have been used traditionally to cure liver diseases, stomach disorders, inflammation, fever, headaches, etc. Ricin, a toxic substance isolated from the castor seeds, is a polypeptide heterodimeric protein consisting of an A chain (30 kDa) and a B chain (35 kDa) linked by disulfide bonds. Interestingly, several studies have revealed that ricin has cytotoxic properties against various cancer cells.

In the present study, the ricin protein extracted from castor seeds was identified using (1) liquid chromatography (LC); (2) column liquid chromatography (CLC); and (3) fast protein liquid chromatography (FPLC), followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Crude ricin (CR) was investigated for its cytotoxicity on A549 lung cancer cells using the Presto Blue test, explored its effect on the process of apoptosis using flow cytometry and Western blot, then measured the ability of cell migration and explored its effect on autophagy using Western blot. In addition, *in silico* study was also conducted to examine the binding that occurs between A chain ricin to proteins that play a role

in the apoptosis stage (caspase-3, -8, and -9) and proteins that play a role in each stage of the autophagy process (Beclin-1, ATG5, LC3 or Light Chain 3, and p62/Sequestosome1). The X-ray crystal structures of caspase-3, -8, -9, Beclin-1, ATG5, LC3, and p62 were downloaded from <https://www.rcsb.org/structure/>. Docking of proteins is done using the ClusPro online server (<https://cluspro.org/>).

Identification of CR showed that all chromatographic techniques used positively confirmed the presence of ricin protein. The presence of ricin protein was indicated by the presence of a double peak in all chromatograms. The doublet peaks indicated the presence of A and B chains of ricin. Electropherogram results from SDS-PAGE showed that ricin protein could be identified at 35 kDa. From the electropherogram results, the CLC method was able to separate two bands at 33 kDa BM (ricin A chain) and 36 kDa (ricin B chain), while the FPLC method could only show one thick band at 35 kDa.

The result of the *in silico* study revealed that ricin A chain possesses a binding mode similar to that of Ac-DEVD-AFC (caspase-3 substrate) namely hydrogen bonding (Ser205, Arg207, Ser209) and hydrophobic interactions (Trp206 and Phe256). Ricin-A interacts with Arg413 and Ser411 located antiparallel in the binding pocket of caspase-8. A portion of ricin-A also binds to Val410, a residue located in the S2 pocket of caspase-8. In addition, ricin A chain interacts with several amino acid residues in caspase-9. Meanwhile, the results of docking ricin A chain with autophagy proteins showed that ricin A chain can interact with Beclin-1, ATG5, LC3, and p62 through the formation of hydrogen bonds in amino acid residues.

The *in vitro* test results showed that CR had cytotoxicity to lung cancer cells A549 with an IC<sub>50</sub> value of 40.94 ppm, higher than that of cisplatin which had an IC<sub>50</sub> of 10.98 ppm, this indicates that the toxicity of CR is lower than cisplatin. Flow cytometry analysis indicated that cell death by CR was caused by apoptosis as well as necrosis, but that apoptosis occurred more frequently than necrosis, suggesting that CR was more potent in inducing apoptosis than necrosis. The mechanism of apoptotic cell death mediated by activation of caspase-9 and caspase-3 by Western blot showed increased expression of both apoptotic proteins. In the cell migration assay, CR and cisplatin inhibited cell migration depending on concentration and time, and the highest effect was shown by a concentration of 1.0 ppm with gap closure of 3.10 and 3.28% in 48 hours of incubation, respectively. The results of the autophagy activity test showed that CR could decrease Beclin-1 levels and increase ATG5 levels, which depended on concentration, as well as decrease LC3-II levels and increase p62 levels. This proved that CR can inhibit autophagy at an early stage in A549 lung cancer cells. Inhibition of autophagy was also

demonstrated by cisplatin because its effect on autophagy marker proteins was similar to that of CR.

Taken together, CR shows a potential beneficial effect as an anticancer drug candidate, however, further research is needed for revealing the complete profile and mechanism of anticancer activity.

**Keywords:** Crude Ricin, A549 Lung Cancer Cells, Apoptosis, Autophagy.