

## Pengaruh pH, suhu dan penyimpanan pada stabilitas protein MJ-30 dari daun *Mirabilis jalapa* L

### Effects of pH, temperature and storage on the stability of MJ-30 protein isolated from *Mirabilis jalapa* L leaves

Sudjadi, Zulies Ikawati, Sismindari dan Putu Riana Suastari Rahayu

Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta

---

#### Abstrak

Ekstrak gubal daun *Mirabilis jalapa* L mampu memotong DNA superkoil pUC18 dan bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa dan Raji. Pemurnian dengan kromatografi penukar kation menghasilkan protein 30 kD (MJ-30) yang mampu memotong DNA superkoil dan juga mempunyai aktivitas rRNA N-glikosidase, seperti aktivitas yang dipunyai *Ribosome Inactivating Protein* (RIP).

MJ-30 dalam daun *M.jalapa* L dimurnikan dengan kombinasi pengendapan bertingkat amonium sulfat dan kromatografi penukar kation dengan elusi gradien NaCl. Protein 30 kD (MJ-30), diuji stabilitasnya terhadap pH, suhu dan penyimpanan.

Uji stabilitas menunjukkan bahwa protein MJ-30 menunjukkan aktivitas yang sama pada pH 5 dan 6, dan menurun aktivitasnya dengan naiknya pH. Protein ini stabil pada suhu inkubasi 30<sup>0</sup> - 55<sup>0</sup>C dan setelah itu menurun aktivitasnya dengan naiknya suhu. Penyimpanan pada suhu 4<sup>0</sup>C stabil sampai pada hari ke12 dan setelah itu terlihat penurunan aktivitas. Penyimpanan pada suhu 30<sup>0</sup>C MJ-30 stabil hanya sampai pada hari ke 3. Penambahan gliserol 9% mempertahankan stabilitas aktivitasnya sampai hari ke 18 baik pada penyimpanan 4<sup>0</sup>C maupun pada 30<sup>0</sup>C.

**Kata kunci** : Protein MJ-30, daun *Mirabilis jalapa* L, stabilitas, pH, suhu , penyimpanan

#### Abstract

The total protein of *Mirabilis jalapa* L leaves had the ability to cleave supercoiled DNA and showed toxicity on HeLa and Raji cell-lines. The 30 kD protein (MJ-30) purified by cationic exchange chromatography possessed activities as RIP e.g DNA supercoiled cleavage and RNA N-glycosidase activity. The aim of this study was to prepare pure MJ-30 and to observe the stability of MJ-30 .

MJ-30 of *M.jalapa* L leaves was purified using the combination of ammonium sulphate fractionation and cationic exchange chromatography with NaCl gradient elution. MJ-30 was subjected for its stability to assays against pH, temperature, and storage period.

Stability assay showed that MJ-30 is stabil at pH 5-6, then the activity decreased as the pH increased. This protein was stable at 30<sup>0</sup> - 55<sup>0</sup>C, and the activity decreased when the temperature increased. Storage at 4<sup>0</sup>C, MJ-30 was stable until 12 days but the activity was decreasing. However, at 30<sup>0</sup>C, MJ-30 was stable for 3 days only. Glycerol addition to the MJ-30 solution has made the activity stable for 18 days at 4<sup>0</sup>C and 30<sup>0</sup>C storage.

**Keyword** : Protein MJ-30, Leaves of *Mirabilis jalapa* L, stability, pH, temperature, storage

---

## Pendahuluan

*Mirabilis jalapa* L. (bunga pukul empat) diketahui pada akar dan bijinya mengandung *Mirabilis Antiviral Protein* (MAP) yang mampu menghambat infeksi virus tanaman (Kataoka *et al.*, 1991, Kobo *et al.*, 1990, Vivanco *et al.* 1999). Daun tanaman ini dapat digunakan sebagai obat bisul. Ekstrak gubal daun tanaman ini diketahui mampu memotong DNA superkoil dan mempunyai aktivitas RNA N-glikosidase (Sismindari and Lord, 2000) Ekstrak tersebut bersifat sitotoksik terhadap beberapa sel kanker. Kematian sel HeLa oleh ekstrak itu ditunjukkan melalui mekanisme apoptosis (Sudjadi *et al.*, 2002). Sedangkan kematian pada sel Raji diduga melalui proses nekrosis (Ikawati *et al.*, 2002). Ekstrak itu juga memiliki aktivitas RNA N-glikosidase seperti aktivitas yang ditunjukkan oleh *Ribosom Inactivating Protein* (RIP). Untuk mempelajari protein yang bertanggung jawab terhadap proses tersebut maka Sudjadi *et al.* (2003) mengisolasi protein 30 kD yang mampu memotong DNA superkoil dan memiliki aktivitas RNA N-glikosidase. Seperti namanya RIP dikenal karena kemampuannya menghambat sintesis protein. Beberapa RIP telah diisolasi dari berbagai tanaman, kebanyakan merupakan anggota RIP tipe 1 yang terdiri dari satu rantai polipeptida dengan ukuran sekitar 30 kDa. Hanya sedikit RIP tipe 2 yang telah diisolasi dan terdiri dari protein heterodimer dengan ukuran sekitar 60 kDa (Barbieri *et al.*, 1993). Uji aktivitas RIP secara kuantitatif dilakukan dengan melihat penghambatan sintesis protein *in vitro* dengan menggunakan asam amino radioaktif dan kemudian diukur radioaktivitasnya protein yang terbentuk (Arias *et al.*, 1992). Metode lain dengan mengukur radioaktivitas  $[^3\text{H}]$ adenin yang dilepaskan dari substrat plasmid (Brigotti *et al.*, 1998). Aktivitas pemotongan DNA superkoil merupakan metode yang sederhana, cepat dan dapat dilakukan menjadi semi-kuantitatif.

Aktivitas setiap enzim dipengaruhi oleh pH dan juga suhu. Stabilitas enzim tersebut dalam penyimpanan juga dipengaruhi oleh suhu, lama penyimpanan dan zat tambahan yang mampu menjaga stabilitas struktur kuaternernya. Selama penelitian ini ditunjukkan bahwa stabilitas aktivitas protein dapat berubah

dari satu preparasi dengan yang lain. Oleh karena itu pada penelitian ini diuji stabilitas protein 30 kD dan juga ekstrak gubalnya terhadap beberapa faktor yang mungkin mempengaruhinya, seperti pH, suhu dan lama penyimpanan serta penambahan bahan penstabil.

## Metodologi

### Bahan

Daun *Mirabilis jalapa* berbunga merah, berumur sekitar 5 bulan, tumbuh didaerah Pogung Sleman Yogyakarta dan telah diidentifikasi oleh Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

### Subyek

Protein total dan MJ-30 dari daun *M.jalapa*, DNA superkoil pUC18  
Variabel uji. a. pH bufer dari 5, 6, 7, 8, 9, dan 10; b. suhu reaksi dari 30, 37, 42, 50, 70, 90°C; c. lama penyimpanan dari 1, 3, 6, 12 dan 18 hari, dengan atau tanpa penambahan gliserol 9%.

### Alat

Kromatografi cair Perkin Elmer Nelson LC-1022 (Lab. Kimia Organik FMIPA UGM) dengan kolom CM-Sepharose CL-6B dan Sephacryl S-300HR (Pharmacia LKB Biotech); Elektroforesis gel agarosa.

### Pembuatan fraksi protein dari daun *Mirabilis jalapa* L

Daun *Mirabilis jalapa* L dikumpulkan segar, dicuci bersih, lalu dipotong kecil-kecil. Sebanyak 30 gram ditempatkan pada mortir steril, ditumbuk halus dengan penambahan 80 ml dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M natrium klorida pada suhu 4°C. Ekstrak yang diperoleh disentrifugasi 28.000 g selama 30 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatan ditambah amonium sulfat dengan kejenuhan 100%. Larutan disentrifugasi 1500 g selama 10 menit pada suhu 4°C. 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. Endapan dibuang dan supernatan merupakan sampel fraksi protein (Stürpe *et al.*, 1983). Kadar protein total ditetapkan dengan mengukur serapan pada 280 nm dan 260 nm seperti dijelaskan oleh Layne (1957)

### Pemurnian protein dengan kolom CM-Sepharose CL-6B

Sebanyak 0,5 ml sampel fraksi protein dimasukkan ke dalam kolom CM-Sepharose dan

dielusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5. Setelah semua puncak keluar protein yang terikat pada fasa diam dielusi dengan dapar natrium fosfat 50 mM yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien dengan kecepatan alir 5 ml/menit. Fraksi yang diperoleh dengan kadar natrium klorida sekitar 0,25 - 0,3 M diuji aktivitas memotong DNA superkoil (Stirpe *et al*, 1983) Uji kemurnian penetapan ukuran protein dilakukan dengan elektroforesis poliakrilamid-SDS dengan pewarnaan perak nitrat (Sambrook *et al*, 1989).

**Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil untai ganda**

Enam µg DNA plasmid pUC18 dicampur dengan 1 µl dapar Tris-Cl 0,5 M pH 8, MgCl<sub>2</sub> 0,1M, NaCl 1M (10xTMN) dan fraksi protein dengan kadar tertentu, ditambahkan aquabidest hingga volume akhir 10 µl, diinkubasi pada suhu 30°C selama satu jam. Kemudian ditambah 2 µl dapar pemuat dan dielektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% dengan kekuatan 60 Volt (Ling *et al*, 1994).

**Uji stabilitas**

- a. Stabilitas terhadap pH. Sejumlah protein tertentu diinkubasi selama 1 jam dalam bufer TMN dengan pH 5, 6, 7, 8, 9 dan 10. Kemudian masing-masing diuji aktivitasnya memotong DNA superkoil.
- b. Stabilitas terhadap suhu. Sejumlah protein dalam bufer fosfat diinkubasi selama 20 menit pada suhu

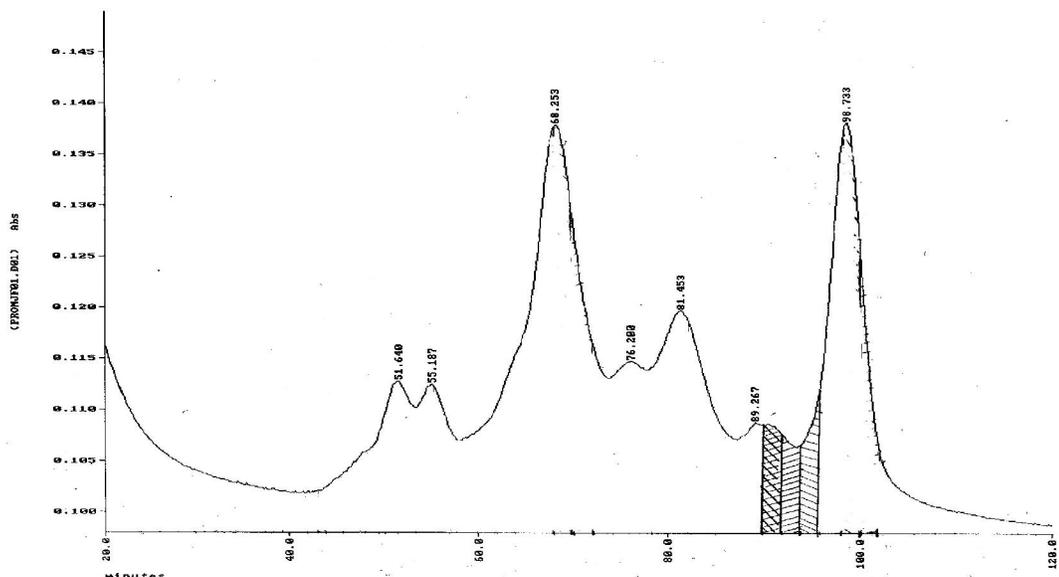
30<sup>0</sup>, 37<sup>0</sup>, 42<sup>0</sup>, 55<sup>0</sup>, dan 90<sup>0</sup>C. Masing-masing sampel kemudian diuji aktivitasnya memotong DNA superkoil.

- c. Stabilitas terhadap lama penyimpanan. Sejumlah protein dengan dan tanpa penambahan gliseol 9%, masing-masing disimpan pada suhu 4<sup>0</sup> dan 30<sup>0</sup>C selama 1, 3,6, 12 dan 18 hari. Masing-masing sampel diuji aktivitasnya memotong DNA superkoil

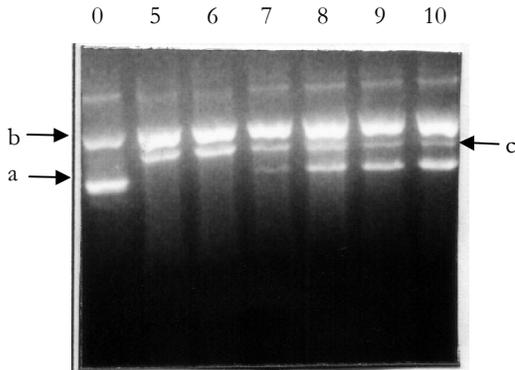
- d. Analisis data. Aktivitas pemotongan DNA superkoil dinyatakan dalam skor 0 -5. Skor nol, tidak ada aktivitas pemotongan DNA superkoil. Skor satu, terjadi penipisan DNA superkoil. Skor dua, terjadi penipisan DNA superkoil dan penebalan pita nik-sirkuler. Skor tiga, DNA superkoil lebih tipis dan nik-sirkuler lebih tebal. Skor empat, nik-sirkuler lebih tebal dan muncul pita linier. Skor lima, DNA superkoil terpotong habis.

**Hasil Dan Pembahasan**

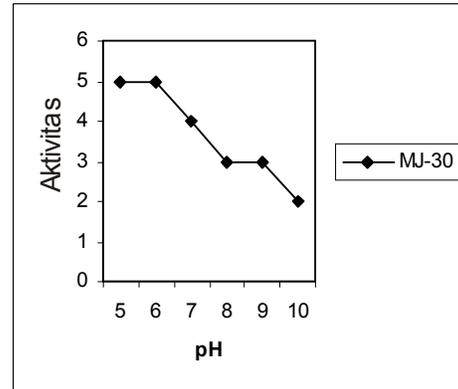
Pada penelitian sebelumnya (Sudjadi *et al*, 2003) pemurnian 30 kD protein (MJ-30) dilakukan dengan pengendapan amonium sulfat jenuh dan kemudian dipisahkan dengan kromatografi penukar kation. Dari pengalaman sebelumnya diperoleh data bahwa protein yang mampu memotong DNA superkoil mengendap pada kejenuhan amonium sulfat 50-70%. Dalam percobaan ini protein tersebut diendapkan dengan amonium sulfat 40-80%



Gambar 1. Kromatogram protein daun *M.jalapa* L. pada menit 30 -120 dengan elusi gradien NaCl 0 -0,5M. Bagian terasir mempunyai aktivitas pemotongan DNA superkoil, fraksi MJ-30.



Gambar 2. Elektroforegram pengaruh pH pada aktivitas MJ30. 0. Plasmid tanpa perlakuan; Angka 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 menunjukkan pH. Pita paling atas (b): bentuk nik sirkuler; tengah (c): bentuk linier; paling bawah (a): seperkoil.



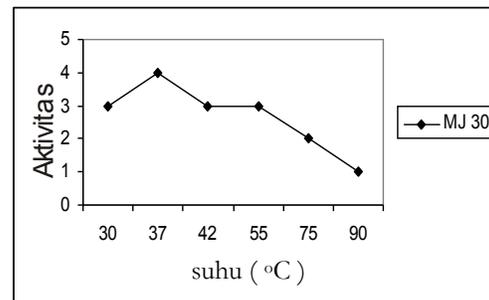
Gambar 3. Grafik hubungan antara aktivitas MJ-30 dengan pH. Aktivitas dinyatakan dengan skor seperti dijelaskan pada metodologi

jenuh, dengan harapan pada hasil pemisahan dengan penukar kation terpisah lebih baik. Hasil menunjukkan bahwa resolusi pemisahan pada daerah sekitar puncak MJ-30 tidak sebaik walaupun muncul beberapa pita lebih tajam (Gambar 1). Fraksi ini perlu dipekatkan dengan *freeze-dry* karena kadarnya dan aktivitasnya sangat rendah.

Enzim dapat kehilangan aktivitasnya karena denaturasi, situs aktifnya menjadi inaktif, dan proteolisis. Denaturasi terjadi karena pH yang ekstrem, suhu dan senyawa denaturan (Scopes, 1994)

Salah satu faktor yang berpengaruh pada stabilitas protein adalah pH. Dalam percobaan ini 72 µg protein diinkubasi dalam bufer TMN dengan seri pH seperti dijelaskan dalam Metodologi. Setelah diinkubasi selama satu jam kemudian dielektroforesis (Gambar 2). Pada pH 5 dan pH 6 DNA superkoil terpotong habis dan terbentuk pita linier. Pada kolom pH 7 DNA superkoil masih tampak dan pita linier lebih tipis yang berarti aktivitasnya menurun (Gambar 3). Percobaan serupa untuk fraksi tidak terikat fasa diam menunjukkan aktivitas pada rentang pH 5 – 7 (data tidak ditunjukkan).

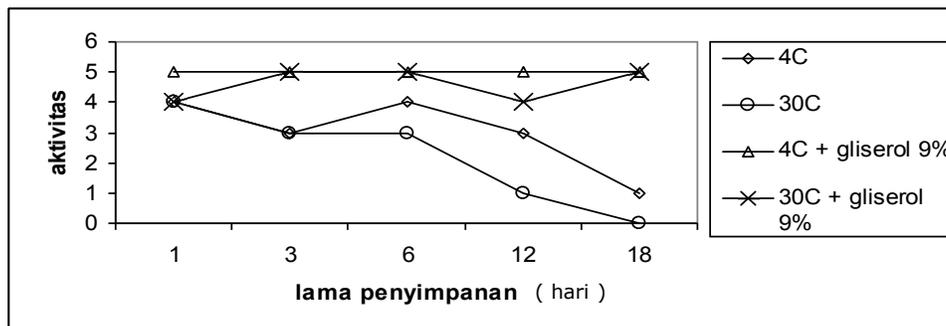
Pada umumnya aktivitas enzim akan meningkat dengan kenaikan suhu. Akan tetapi pada suhu lebih tinggi enzim mulai



Gambar 4. Grafik hubungan antara aktivitas MJ-30 dengan suhu

terdenaturasi sehingga aktivitasnya mulai menurun. Pada uji kali ini protein diinkubasi pada suhu 30, 37, 42, 55, 75, dan 90°C selama 20 menit dan kemudian diuji aktivitasnya memotong DNA superkoil. Hasil menunjukkan bahwa di atas suhu 55°C MJ-30 mulai terdenaturasi. Semakin tinggi suhu semakin besar denaturasi semakin sempurna. Walaupun demikian pada suhu 90°C masih menunjukkan aktivitas yang lemah (Gambar 4). Hal ini mungkin terjadi renaturasi pada waktu uji pemotongan DNA superkoil, 30°C selama 1 jam.

Suhu penyimpanan dan lama penyimpanan merupakan hal penting untuk diteliti sebelum suatu protein dibuat dalam preparat dan digunakan dalam suatu uji. Penyimpanan yang kurang tepat akan mempercepat penurunan aktivitas, sehingga aktivitas yang ditunjukkan oleh suatu enzim



Gambar 5. Grafik hubungan antara aktivitas MJ-30 dan lama penyimpanan dalam hari pada suhu 4°C dan 30°C, dengan dan tanpa penambahan gliserol

benar-benar karena perlakuan bukan karena hal yang lain. MJ-30 yang disimpan pada 4°C stabil sampai dengan hari ke enam dan setelah itu terjadi penurunan aktivitas yang lebih lambat jika dibandingkan jika disimpan pada suhu 30°C (Gambar 5). Hal ini juga terlihat MJ-30 yang disimpan pada suhu 30°C stabil sampai hari ke tiga dan setelah itu terjadi penurunan aktivitas. Pada hari ke 18 sudah kehilangan aktivitas. Hal ini dimungkinkan karena adanya protease didalam larutan itu yang memotong MJ-30. Ini berarti preparat MJ-30 belum murni. Penurunan stabilitas pada penyimpanan itu mungkin disebabkan oleh oksidasi dan pada percobaan ini ditiotreitol tidak ditambahkan pada pembuatan ekstrak. Penurunan aktivitas karena kehilangan kofaktor dalam kasus ini bukan merupakan kemungkinan yang dapat diterima, karena telah banyak penelitian pada beberapa RIP menunjukkan tidak memerlukan kofaktor untuk aktivitasnya.

Seperti telah diketahui secara umum bahwa larutan enzim yang sangat encer akan cepat kehilangan aktivitasnya. Hal itu dapat dicegah dengan penambahan BSA atau gliserol sehingga kekentalannya menyerupai cairan sel. Gliserol, bercampur dengan air, membentuk ikatan hidrogen dengan air, mengurangi gerakan air sehingga mengurangi aktivitas air (Scopes, 1994). Pada percobaan dengan penambahan gliserol 9% untuk mempertahankan kekentalan menunjukkan bahwa MJ-30 dalam gliserol itu tetap aktif

sampai hari ke 18 baik pada penyimpanan 4°C maupun 30°C (Gambar 5). Hal ini menunjukkan bahwa dalam preparat MJ-30 tidak ada protease dan kekentalan sangat diperlukan dalam mempertahankan aktivitasnya bukan hanya pH dan konsentrasi ion. Data ini menunjukkan kekentalan berperan dalam menjaga stabilitas struktur suatu protein. Pada penyimpanan suhu rendah, adanya gliserol mengakibatkan larutan protein itu tidak membeku sehingga tidak merusak konformasi protein.

### Kesimpulan

Protein MJ-30 paling aktif pada pH 5–6, kenaikan pH menurunkan aktivitasnya. Protein ini stabil sampai dengan suhu 55°C, kenaikan suhu di atas suhu 55°C menurunkan aktivitasnya. Penyimpanan pada suhu 4°C lebih tahan dibandingkan pada suhu 30°C, dan penambahan gliserol 9% menaikkan stabilitasnya.

### Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Project Grant QUE Fakultas Farmasi UGM atas pemberian dana penelitian ini dengan nomer kontrak : 05/QUE-Far/PG/2002. Peneliti juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Ilmu Hayati UGM dan Laboratorium Kimia Organik FMIPA UGM atas segala fasilitas yang telah diberikan.

## Daftar Pustaka

- Arias,F.J., Rojo,M.A., Ferreas,J.M., Iglesias,R., Munoz,R., Rocher,A, Mendez,E., Barbieri,L. and Girbes,T., 1992, Isolation and partial characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Petrocopis glaucifolia* (Lag.) Boiss, *Planta*, **186**, 532-540.
- Barbieri, L., Batteli, M.A., Stirpe, F., 1993, Ribosome inactivating proteins from Plants, *Biochem et Biophys. Acta*, 405-410
- Brigotti,M., Barbieri,L., Valbonesi,P., Stirpe,F., Montarano,L. and Sperti,S., 1998, A rapid and sensitive method to measure the enzymatic activity of ribosome-inactivating proteins, *NAR*, **26**, 4306-4307.
- Ikawati,Z, Sudjadi, Sismindari, Sari,R.P., Maulani,N ,2002, Efek fraksi protein sejenis RIP (*Ribosome-inactivating protein*) yang diisolasi dari akar *Mirabilis jalapa* L terhadap proses kematian sel HeLa dan Raji, *Biologi*, **2**,769-783
- Kataoka, J., Habuka, N., Furuno, M., Miyano, M., Takanami, Y., Koiwai, A., 1991. DNA sequence of *Mirabilis* antiviral protein (MAP), a ribosome-inactivating protein with an antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L and its expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **266**, 8426-8430.
- Kubo, S., Ikeda, T., Imaizumi, S., Takanami, Y., Mikami, Y., 1990, A potent plant virus inhibitor found in *Mirabilis jalapa* L. *Ann Phytopathol Soc Jpn* **56**, 481-487.
- Layne,E., 1957, *Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins*, Methods Enzymol., Colowick and Kaplan. Academic Press., New York, **3**, 477
- Ling, J., Liu, W., Wang, T.P., 1994, Cleavage of supercoiled double stranded DNA by several ribosome inactivating proteins in vitro, *FEBS Letters*, **345**, 143-146
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. and Maniatis,T., 1989, *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Scope,R.K., 1994, *Proteins purification, Principles and Practice*, Second Edition, Springer-verleg, New York, 246-252
- Sismindari and Lord,J.M., 2000, Ribosome-Inactivating RNA N-glycosidase activity of *Mirabilis jalapa* L, *Morinda citrifolia* L and *Carica papaya* L, *Indon J Biotech*, 324-345
- Stirpe,F., Gasperi-Campani,A., Barbieri,L., Falasca,A., Abbondanza,A., Stevens,W.A., 1983, Ribosome-inactivating Proteins from the Seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Argositemma githago* L (corn cocle) and *Asparagus officinalis* L. (asparagus) and from the Latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree)., *Biochem. J.*, **216**, 617 - 625.
- Sudjadi, Ikawati.Z., Sismindari, Arini,K.F., 2002, Efek fraksi protein dari biji *Mirabilis jalapa* L pada proses kematian kultur sel HeLa, *Biologi*, **2**, 743 -753.
- Sudjadi, Sismindari, Herawati,T., Prasetyowati,A.T., 2003, Pemurnian *Ribosome-Inactivating Protein* (RIP) dari daun *Mirabilis jalapa* L dengan kolom CM-Sepharose CL-6B dan Sephacryl S-300HR, *Majalah Farmasi Indonesia*, **14**, 316 – 321.
- Vivanco, J.M., Qurci, M., Salazar, L.F., 1999, Antiviral and antiviroid activity of MAP-containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. *Plant Dis.* **83**, 1116-1121.
- Yang, S.W., Ubillas, R., McAlpine, J., Stafford, A., Ecker, D.M., Talbot, M.K., Rogers, B., 2001, Three new phenolic compounds from a manipulated plant cell culture, *Mirabilis jalapa*. *J. Nat. Prod.* **64**, 313-317.