

Efek sitotoksik suatu protein seperti *Ribosome inactivating Proteins* yang bersifat asam dari daun *Mirabilis jalapa* L. pada sel kanker

Cytotoxic effects of an acidic Ribosome-inactivating Protein like protein isolated from *Mirabilis jalapa* L. leaves on cancer cell-lines

Sudjadi *, Lucia D Witasari, Modesta T Sadarum, Nia Nastity dan Sismindari
Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Abstrak

Pada umumnya pemurnian *Ribosome-inactivating protein* (RIP) dengan menggunakan suatu kromatografi penukar kation sehingga diperoleh protein yang bersifat basa, seperti misalnya MJ-30 yang diisolasi dari daun *Mirabilis jalapa*. Fraksi protein *M.jalapa* yang tidak terikat pada kolom tersebut ternyata juga menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil dan bersifat sitotoksik terhadap beberapa sel kanker. Oleh karena itu protein tersebut perlu dimurnikan dan dikarakterisasi.

Protein total diperoleh dengan mengendapkan ekstrak daun *M.jalapa* dengan amonium sulfat sampai jenuh. Setelah dilakukan dialisis, larutan protein tersebut dilewatkan kolom *Ionenaustaucher Typ II*, suatu penukar anion. Protein yang terikat dielusi dengan NaCl bergadien dari 0,0 – 0,5 M dalam bufer fosfat. Fraksi aktif ditentukan menggunakan uji aktivitas pemotongan DNA superkoil dan selanjutnya diuji aktivitas sitotoksisnya

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi yang mampu memotong DNA superkoil terelusi pada 0,35-0,40 M NaCl. Protein asam, MJ-C, bersifat sitotoksik terhadap sel HeLa, myeloma dan T47D dengan harga LC₅₀ berturut-turut 14,3 µg/mL, 7,4 µg/mL dan 27,8 µg/mL. Ternyata MJ-C lebih poten dari pada MJ-30 yang bersifat basa.

Kata kunci : RIP asam, sitotoksik, *Mirabilis jalapa*

Abstract

Most purification approaches of Ribosome-inactivating Proteins (RIPs) used a cation exchange chromatography resulting highly basic proteins, such as MJ-30 isolated from *Mirabilis jalapa* leaves. The *M.jalapa* unbounded protein fractions of the column showed cleavage activity on supercoiled double stranded DNA and possessed cytotoxic effects on cancer cell lines. So the purification and characterization of the acidic protein was needed to be done.

Total proteins of *M.jalapa* leaves was collected from precipitating process of the extract using ammonium sulphate until saturated. After dialysis, the proteins was applied into the weak base anion exchanger Ionenaustaucher Typ II. The bounded proteins was eluted with 0.0 to 0.5 M NaCl gradient in phosphate buffer. Active protein fractions were determined by supercoiled DNA cleavage activity and then cytotoxic activity was testes.

Results showed that protein fraction eluted at 0.35 – 0.40 M NaCl possessed cleavage activity on supercoiled DNA. The acidic protein, MJ-C, was

toxic on HeLa, Myeloma and T47D cell lines, with the LC₅₀ of 14.3 µg/mL, 7.4 µg/mL and 27.8 µg/mL, respectively. The MJ-C was more potent than the basic protein MJ-30.

Key words: acidic RIP, cytotoxic, *Mirabilis jalapa*

Pendahuluan

Ribosome-inactivating protein (RIP) merupakan protein toksik, yang terdapat secara luas pada tanaman dan mikroorganisme. Pada umumnya RIP yang telah diisolasi merupakan protein bersifat basa karena pendekatan waktu pemurnian RIP menggunakan kromatografi penukar kation sehingga protein yang terikat fase diam merupakan protein basa. RIP tersebut menunjukkan harga pI antara 9-11 (Bolognesi, *et al.*, 2002, Hartley *et al.*, 1996). Efek sitotoksik RIP tersebut disebabkan kemampuannya memotong adenin⁴³²⁴ pada 28S rRNA sehingga faktor perpanjangan tidak dapat berikatan dan sintesis protein berhenti. Aktivitas rRNA N-glikosidase ini merupakan penanda aktivitas RIP. Selain itu, RIP juga mempunyai aktivitas memotong DNA superkoil (Ling *et al.*, 1994). Ternyata RIP juga dapat melakukan depurinasi DNA dan asam nukleat lainnya. Hal ini membuka pandangan baru tentang mekanisme kematian sel oleh toksin ini (Peumans *et al.*, 2001). RIP mempunyai aktivitas biologis immunosupresif, abortifasien, antivirus dan sitotoksik terhadap sel mamalia (Barbieri *et al.*, 1993; Stripe *et al.*, 1992; Narayanan *et al.*, 2004).

Berdasar strukturnya saat ini, RIP dikelompokkan dalam tiga tipe RIP. RIP tipe 1 seperti trichosantin terdiri dari rantai polipeptida tunggal, dengan ukuran sekitar 30 kDa. Trichosantin bersifat abortifasien, yang dimurnikan dari jamu tradisional China Tian Hua Fen (Hartely *et al.*, 1996). RIP tipe 2 seperti risin diisolasi dari *Ricinus communis*, terdiri dari dua subunit yang diikatkan dengan ikatan disulfida, berukuran sekitar 60 kDa. RIP jenis ini mempunyai bagian lektin yang dapat berinteraksi dengan reseptor pada membran sel sehingga subunit yang aktif masuk kedalam sitosol. Sedangkan RIP tipe 3 seperti JIP60 yang diisolasi dari *Hordeum vulgare*, merupakan protein untai tunggal yang tidak membawa bagian lektin. Jenis ini disintesis dalam bentuk tidak aktif yang kemudian diubah menjadi

bentuk aktif melalui proses proteolisis (Peumans *et al.*, 2001)

Biji *Mirabilis jalapa* L. dilaporkan mengandung protein sejenis RIP karena protein totalnya mempunyai aktivitas N-glikosidase terhadap rRNA *Saccharomyces cerevisiae* (Sismindari and Lord, 2000). Penelitian pada biji, daun dan akar *M.jalapa* menunjukkan bahwa daun mengandung aktivitas paling besar. Oleh karena itu penelitian selanjutnya difokuskan pada RIP yang terdapat pada daun *M.jalapa*. Pemurnian RIP pada daun telah dilakukan dengan penukar ion CM-Sepharose CL-6B dan dilanjutkan dengan Sephacryl S-300HR menghasilkan protein MJ-30 yang bersifat basa dengan ukuran sekitar 30 kDa. (Sudjadi dkk., 2003). Takanami (1990) telah melaporkan *Mirabilis Antiviral Protein* (MAP) yang diisolasi dari akar *M.jalapa*, dengan ukuran 24,2 kDa dan bersifat basa. Efek sitotoksik MJ-30 terhadap beberapa sel menunjukkan bahwa MJ-30 bersifat lebih sitotoksik pada sel HeLa, Myeloma, T47D, dan SiHa daripada terhadap sel Vero maupun sel mononuklear darah perifer (Sudjadi dan Ikawati, 2003; Ikawati dkk., 2006). Protein ini mampu menginduksi kematian sel HeLa melalui proses apoptosis. Sedangkan pada sel Raji diduga melalui nekrosis (Ikawati dkk., 2003).

Analisis terhadap protein tidak terikat pada kolom CM-Sepharose CL-6B ternyata menunjukkan adanya aktivitas pemotongan DNA superkoil dan menunjukkan sitotoksitas pada sel HeLa, SiHa dan T47D (Sudjadi dan Ikawati, 2003). Hal ini menunjukkan bahwa dalam fraksi tersebut ada kemungkinan mengandung protein sejenis RIP yang bersifat asam. Selama ini RIP bersifat asam sangat sedikit dilaporkan, seperti RIP b-32 dari biji *Zea mays* berukuran 32 kDa dengan harga pI 6,1 (Mundy *et al.*, 1994) dan charantin dari biji *Momordica charantia* berukuran 9,7 kDa (Parkash *et al.*, 2002). Penelitian ini melaporkan pemurnian protein sejenis RIP bersifat asam dari daun *M.jalapa* dengan penukar anion dan protein tersebut bersifat sitotoksik terhadap beberapa sel kanker.

Metodologi

Bahan dan alat

Bahan uji adalah daun *M.jalapa* berbunga merah diambil dari daerah Sleman pada bulan Desember 2005 kemudian dilakukan determinasi. Subyek uji adalah sel HeLa, Myeloma dan pUC18 yang diperoleh dari stok unit Ilmu Hayati, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM. Sel T47D diperoleh dari Prof. Dr. Tatsuo Takeya, Nara Institute of Science and Technology, Japan. Bahan kimia dan media yang digunakan merupakan bahan standar yang biasa digunakan pada percobaan di laboratorium dan suatu penukar anion *weak base anion exchanger Ionenastancher Typ II* (Merck). Alat uji menggunakan mikroskop, elektroforesis gel agarosa, spektrofotometer, kromatografi cair Pharmacia LKB GP2500 Plus.

Pembuatan fraksi protein dari daun *Mirabilis jalapa L.*

Sebanyak 60 gram daun *Mirabilis jalapa L.* ditempatkan pada mortir steril, ditumbuk halus dengan penambahan 160 mL dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung natrium klorida 0,14 M pada suhu 4°C. Ekstrak yang diperoleh disentrifugasi 2000 g selama 20 menit pada suhu 4°C. Selanjutnya supernatan ditambah amonium sulfat sehingga jenuh. Larutan disentrifugasi 2000 g selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dalam sedikit mungkin dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5. Selanjutnya dilakukan dialisis dengan menggunakan dapar pelarut. Hasil dialisis disentrifugasi 2000 g selama 15 menit pada suhu 4°C, 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 Ionenaustausher Typ II

Sebanyak 1 mL sampel larutan protein total dimasukkan ke dalam kolom *Ionenastancher Typ II* dan dielusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 untuk mengelusi semua protein tak terikat, sampai serapan pada 280 nm kurang dari 0,05. Protein yang terikat dielusi dengan NaCl bergadien dari 0,0 – 0,5 M dalam bufer fosfat dengan kecepatan alir 0,5 mL/menit. Fraksi ditampung dan puncak diukur pada 280 nm, kemudian diuji aktivitas pemotongan DNA superkoil (Sudjadi dkk., 2003)

Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil untai ganda

Tiga µg DNA plasmid pUC18 dicampur dengan 1 µL dapar Tris-HCl 50 mM, pH8, MgCl₂

100mM, NaCl 100 mM 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 sitotoksitas

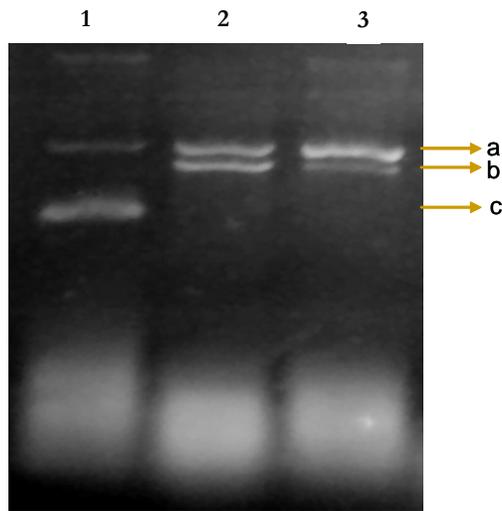
Seratus mikroliter suspensi sel dengan konsentrasi 3×10^4 sel / 100µL, distribusikan pada setiap sumuran dan diinkubasi dengan satu seri jumlah protein selama 24 jam pada inkubator dengan 5 % CO₂ pada suhu 37°C. Sebagai kontrol digunakan seratus mikroliter sel yang diinkubasikan dengan media tumbuh ditambah 10 % FBS. Pada akhir inkubasi, 10 µl suspensi ditambah dengan trypan blue dan dihitung jumlah sel hidup dengan hemositometer. Sel hidup diketahui berbentuk bulat, terang dan intinya jernih. Persen kematian sel diperoleh dengan menghitung perbedaan jumlah sel hidup pada kontrol dengan jumlah sel hidup pada perlakuan, dibagi dengan jumlah sel sel hidup pada kontrol, dikalikan 100%. Harga LC₅₀ dihitung dengan metode probit.

Hasil Dan Pembahasan

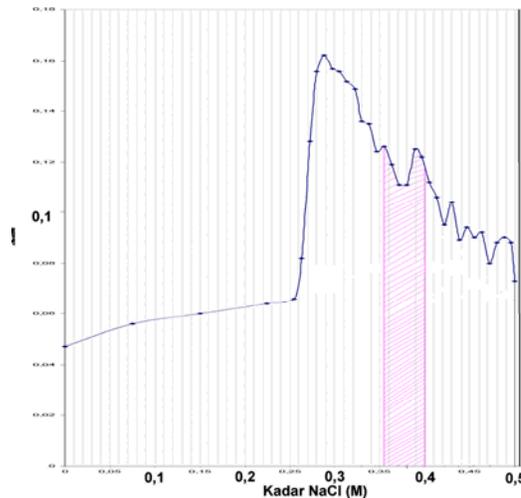
Permurnian

Pengendapan protein dalam ekstrak dengan penambahan amonium sulfat kejenuhan 100 % dimaksudkan untuk memisahkan senyawa non-protein yang mungkin juga mempunyai sifat sitotoksik. Protein total hasil dialisis yang diperoleh mencapai sekitar 8,57%. Hasil ini kurang tepat karena diganggu oleh warna coklat muda larutan yang juga menyerap pada panjang gelombang 280 nm. Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil menunjukkan bahwa *crude extract* dan ekstrak hasil dialisis mampu memotong DNA superkoil menjadi bentuk nik-sirkular dan linier pada jumlah protein 0,8 µg (Gambar 1). Aktifitas ini merupakan salah satu aktivitas RIP yang dipilih untuk penapisan karena metode ini cukup sederhana dan cepat.

Hasil pemisahan menggunakan kolom *Ionenastancher Typ II*, suatu penukar anion dengan fasa diam bersifat basa lemah diperoleh satu puncak besar pada awal elusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,14 M. Puncak tersebut mengandung protein tidak terikat pada fasa diam karena protein tersebut bersifat netral dan



Gambar 1. Elektroforegram uji aktivitas pemotongan DNA superkoil. Kolom 1 pUC18 tanpa perlakuan, kolom 2 dengan penambahan ekstrak total, kolom 3 dengan penambahan hasil dialisis. a. Bentuk nik sirkuler, b. bentuk linier dan c. bentuk superkoil.



Gambar 2. Kromatogram fraksi terikat fase diam elusi NaCl bergradien. Bagian terasir menunjukkan bagian yang mempunyai aktivitas pemotongan DNA superkoil

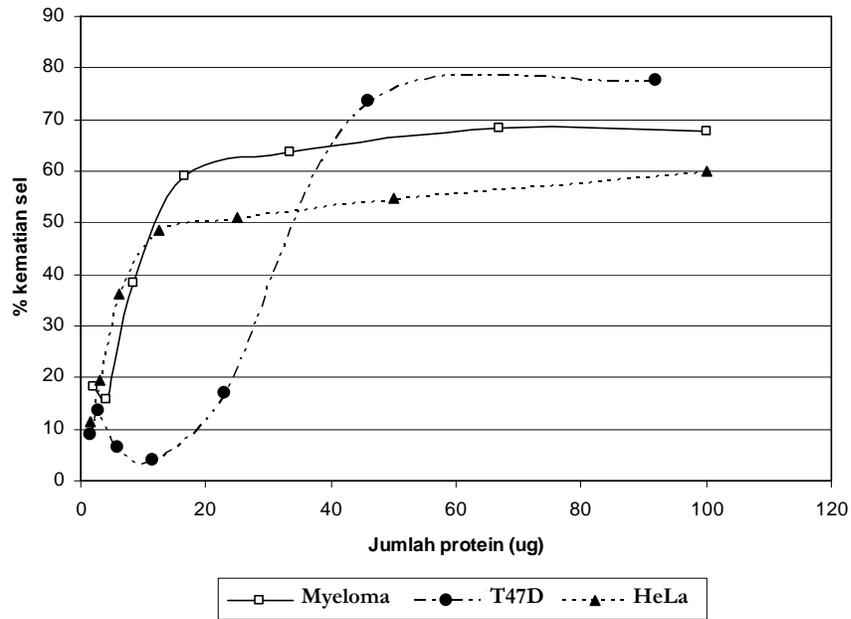
basa pada pH 6,5. MJ30 mestinya ikut keluar kolom. Pada waktu elusi dengan NaCl bergradien menghasil puncak kecil yang mengandung protein yang asam dan terikat pada fasa diam. Pola serupa juga terjadi pada

pemisahan MJ-30 dengan kolom CM-Sepharose CL-6B, suatu penukar kation (Sudjadi dkk., 2003). Hal ini menunjukkan bahwa sebagian besar protein yang terkandung dalam protein total tidak cukup kuat terikat pada kolom karena muatannya yang relatif netral pada pH 6,5. Analisis terhadap fraksi terikat kolom dengan uji pemotongan DNA superkoil menunjukkan bahwa protein yang mampu memotong DNA superkoil terelusi pada konsentrasi NaCl 0,35 – 0,40 M (Gambar 2). Hal ini menunjukkan bahwa protein tersebut mempunyai netto muatan negatif lebih banyak. Protein yang terelusi pada konsentrasi NaCl lebih rendah mempunyai neto muatan negatif lebih sedikit. Fraksi 0,35-0,40 M yang selanjutnya disebut sbagai MJ-C tersebut diakui belum murni. Hal ini dapat dilihat dari gambar elektrogramnya yang tidak menunjukkan pemisahan dengan baik. Fasa diam *Ionenaustaucher Typ II* ini kurang mendukung pemisahan karena hanya dikatakan sebagai suatu basa lemah, tidak diketahui secara pasti gugus aktif maupun ukuran partikelnya. Oleh karena itu pada penelitian berikutnya akan dicoba menggunakan DEAE-Sepharose (Sigma).

Berdasarkan perhitungan kadar protein dalam fraksi NaCl 0,35-0,40 M maka diperoleh kadar MJ-C dalam daun sekitar 0.008%. Protein ini kemudian digunakan untuk percobaan sitoksisitas terhadap sel HeLa, myeloma dan T47D yang merupakan representatif sel kanker. Sel HeLa merupakan sel kanker leher rahim terinfeksi Human Papilloma Virus 18 (Desaintes *et al.*, 1999). Sel myeloma adalah kanker sel plasma (Berenson and Miguel, 2003). Sedang sel T47D merupakan sel kanker payudara (Wozniak and Keely, 2005).

Uji sitotoksik

Setelah dilakukan koreksi pada pengaruh pelarut terhadap kematian sel HeLa, myeloma dan T47D, hasil uji sitotoksik MJ-C (Gambar 3). MJ-C menunjukkan nilai LC_{50} 14,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel HeLa, 7,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel myeloma dan 27,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pada sel T47D. Harga ini sangat kecil jika dibandingkan dengan harga LC_{50} MJ-30 pada sel HeLa adalah 7050 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pada sel myeloma 1250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan pada T47D 361 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sudjadi dan Ikawati, 2003). Hal ini



Gambar 3. Kurva sitotoksitas MJ-C terhadap sel HeLa, myeloma dan T47D. Kurva yang ditunjukkan telah dikoreksi dengan jumlah kematian sel akibat pelarut.

menunjukkan bahwa protein MJ-C yang bersifat asam tersebut memiliki sifat seperti RIP dan mempunyai efek jauh lebih toksik dari pada MJ-30 suatu RIP bersifat basa.

Apabila dilihat dari efek MJ-C yang 13 – 495 kali lebih sitotoksik daripada MJ-30, tidak menutup kemungkinan bahwa MJ-C termasuk RIP tipe 2. Seperti diketahui bahwa baik RIP tipe 1 maupun tipe 2 menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil (Ling *et al.*, 1994) Akan tetapi RIP tipe 2 lebih sitotoksik daripada RIP tipe 1 karena RIP tipe 2 tersebut mempunyai sub-unit B yang memudahkan masuk ke dalam sel. Oleh karena itu perlu dilihat kemungkinan aktivitas yang lain dari RIP untuk membedakan ke dua tipe RIP tersebut, yakni aktivitas RNA N-glikosidase. Dalam hal ini RIP tipe 1 aktif sedangkan RIP tipe 2 tidak aktif sebelum didegradasi untuk memisahkan sub-unit A yang aktif dari sub-unit B yang merupakan pembawa (Hartley *et al.*, 1996; Sismindari and Lord, 2000).

Pada awalnya sifat sitotoksik RIP dijelaskan melalui kemampuannya dalam menghambat sintesis protein melalui aktivitas RNA N-glikosidasenya setelah protein itu masuk ke dalam sel. Setelah itu ditemukan

aktivitas lainnya yang menyatakan bahwa RIP juga mempunyai aktivitas depurinisasi DNA dan aktivitas itu ternyata tidak terdistribusi merata antara RIP yang berbeda dan juga tidak berhubungan dengan aktivitas N-glikosidasenya (Battelly, 2004). Hal ini dapat menjelaskan mengapa MJ-30 mempunyai sifat sitotoksik yang berbeda dengan MJ-C.

Perbedaan aktivitas enzimatik dari berbagai RIP diduga disebabkan adanya perbedaan struktur baik pada lokus aktifnya maupun bagian lain dari rantai protein yang mempunyai aktivitas, yang menentukan spesifitas substrat karena pengaruh interaksi setiap RIP dengan target yang berbeda. Perbedaan yang diamati menunjukkan adanya perbedaan nyata pada efek sitotoksitas dari RIP dibandingkan dengan aktivitas enzimatisnya. Hal ini mungkin disebabkan adanya perbedaan *uptake* RIP dan protein ini harus mencapai target intraselular supaya bersifat toksik (Battelli, 2004). Hal ini menunjukkan ada hubungan nyata antara sitotoksitas dan perjalanan intraselular RIP yang bervariasi tergantung dari jenis sel yang tergantung pada: a) jumlah reseptor untuk RIP pada permukaan sel, b) jenis ligand yang mengarahkan pada

kompartment yang berbeda, dan c) adanya berbagai jalur untuk transport protein itu ke sitosol. Setelah mencapai target, RIP dapat merusak rRNA sehingga ribosom tidak dapat mensintesis protein yang dikenal aktivitas N-glikosidase. RIP juga dapat merusak DNA dan mRNA dengan aktivitas glikosilase polinukleotida adenin. Baik pemberhentian sintesis protein maupun kerusakan DNA dan RNA mengakibatkan sel itu mati.

MJ-C yang asam ini sangat menarik untuk dimurnikan lebih lanjut dengan kolom penyaring molekuler dan perlu diuji aktivitas N-glikosidase sebagai penanda RIP. Sifatnya yang sangat sitotoksik ini merupakan calon yang baik untuk dijadikan imunotoksin.

Kesimpulan

Protein sejenis RIP yang bersifat asam dari daun *M.jalapa* L terelusi dari kolom

Ionenanstaucher Typ II pada konsentrasi NaCl 0,35 -0,40M dan dinamakan MJ-C.

Protein ini (MJ-C) bersifat sitotoksik pada sel HeLa, myeloma dan T47D dengan harga LC₅₀ berturut-turut 14.3 µg/mL, 7.4 µg/ mL; dan 27.8 µg/mL.

MJ-C yang bersifat asam ini jauh lebih toksik dari pada MJ-30 yang bersifat basa pada sel uji.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menyampaikan terima kasih kepada Bapak Rajiman Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM atas bantuannya pada pengoperasian alat kromatografi cair Pharmacia LKB GP2500 Plus.

Daftar Pustaka

- Barbieri, L., Battelli, M. G., and Stirpe, F., 1993, Ribosome-inactivating proteins from plants, *Biochem. Biophys. Acta.*, 1154: 237-282.
- Battelli, M. G., 2004, Cytotoxicity and toxicity to animals and humans of ribosome-inactivating proteins, *Mini-review, Med Chem.*, 4: 513-521.
- Berenson, J. R., and Miguel, J. S., 2003, Multiple myeloma, <http://www.multiplemyeloma.com>, Nopember 2005.
- Bolognesi, A., Polito, L., Lubelli, C., Barbieri, L., Parante, A., dan Stirpe, F., 2002, Ribosome-inactivating and Adenine Polynucleotide Glycosylase Activities in *Mirabilis jalapa* L Tissues, *J. Biol. Chem.*, 277: 13709 - 716.
- Desaintes, C., Goyat, S., Garbay, S., Yaniv, M., and Thierry, F., 1999, Papillomavirus E2 induces p53-independent apoptosis in HeLa cell, *Oncogene*, 18: 4533-4545
- Hartley, M. R., Chaddock, J. A., and Bonnes, M. R., 1996, The structure and Fuction of ribosome-inactivating proteins, *Trends Plant Sci Rev.*, 1(8): 254 - 258
- Ikawati, Z., Sudjadi, Elly, W., Pusputasari, D., and Siswindari, 2003, Induction of apoptosis by protein fraction isolated from the leaves of *Mirabilis jalapa* L on HeLa and Raji cell line, *OPEM*, 3 (3): 151-156.
- Ikawati, Z., Sudjadi and Siswindari, 2006, Cytotoxic against tumor cell lines of a Ribosome-inactivating like protein isolated from leaves of *Mirabilis jalapa* L , *Malaysian J Pharm.Sciences*, 4 (1) *in press*.
- Layne, E., 1957, Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins, in *Method Enzymol.*, 3: 477, Colowick and Kaplan, Academic Press, New York.
- LingJ., Lui, W., and Wang, T. P., 1994, Cleavage of supercoiled double stranded DNA by several Ribosome-inactivating Proteins *in vitro*, *FEBS Letters*, 345: 143- 146.
- Mundy, J., Leah, R., Boston,R., Endo, Y., and Stirpe, F., 1994, Genes encoding ribosome-inactivating proteins, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12: 60-62.
- Narayanan, S., Surolia, A., and Karande, A., 2004, Ribosome-inactivating proteins and apoptosis: abrin causes cell death via mitochondrial pathway in Jurkat cells, *Biochem. J.*, 377: 233-240.

- Parkash, A., Ng, T. B., and Tso, W. W., 2002, Purification and characterization of charantin, a napin-like ribosome-inactivating peptide from bitter melon (*Momordica charantia*) seeds, *J. Peptide Res*, 59: 197-202.
- Peumans, W., Hao, Q., and van Damme, E., 2001, Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidase, *J FASEB*, 15: 1493-1506.
- Sismindari and Lord, J. M., 2000, Ribosome-inactivating proteins RNA N-glycosidase activity of *Mirabilis jalapa* L., *Morinda citrifolia* L., and *Carica papaya* L., *Indon. J. Biotech.*, 342-345.
- 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
- Stirpe, F., Barbieri, R., Batteli, M. G., Soria, M., and Lappi, D. A., 1992, RIP from plants: Present status and future prospect, Review, *Biotech.*, 10: 105-109.
- Sudjadi, Sismindari, Herawati, T., Prasetyowati, A. T., 2003, Pemurnian Ribosome-inactivating Protecin (RIP) dari daun *Mirabilis jalapa* L dengan kolom CM-Sepharose CL-6B dan Sephacryl S-300HR, *MFI*, 14 (2): 316-321.
- Sudjadi dan Ikawati, Z., 2003, Efek sitotoksik protein 30 kD dari daun *Mirabilis jalapa* L pada kultur sel HeLa, myeloma, SiHa, Vero dan mononuklear darah perifer dan uji stabilitasnya, Laporan Penelitian Project-Grand Que Project Fakultas Farmasi UGM.
- Takanami, Y., Kuwata, S., Ikeda, T., and Kubo, S., 1990, Purification and characterization of the anti-plant viral protein from *Mirabilis jalapa* L., *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.*, 56: 488-494.
- Wosniak, M. A., and Keely, P. J., 2005, Use of tree-dimensional collagen gels to study mechanotransduction in T47D breast epithelial cells, *Biol. Proced Online*, 7: 144-146. d

* Korespondensi : Prof. Dr. Sudjadi, MS., Apt.
Fakultas Farmasi UGM, Jl. Sekip Utara Yogyakarta, 55281,
Telp. +62 (0274)902565, Fax. +62 (0274)543120,
E-mail : jadi_farma@ugm.ac.id