

Efek Sitotoksik Protein dari Daun *Mirabilis jalapa* L. Hasil Pemurnian dengan kolom CM Sepharose CL-6B terhadap Kultur Sel HeLa

Ni Putu Ariantari^{1*}, Zullies Ikawati², Sudjadi², Sismindari²

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

²Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada
alamat korespondensi*: ari_dedhika@yahoo.com

Abstract

Mirabilis jalapa L. leaves have been known containing Ribosome Inactivating Proteins (RIPs) base on its N-glycosidase activity and cleavage of supercoiled double stranded DNA. The research aims to investigate cytotoxic activity of protein isolated from *Mirabilis jalapa* L. leaves against HeLa cell culture. In this research, crude extract of *Mirabilis jalapa* L. leaves was separated by gradual precipitation using sulphate ammonium followed by dialysis. Further separation of protein fraction with cation exchange chromatography using CM Sepharose CL-6B column and elution with sodium phosphate buffer 5 mM pH 6,5 for 30 minutes continued with sodium phosphate buffer 5 mM pH 6,5 containing 0-0,5 M NaCl by gradient elution for 90 minutes. Cytotoxicity activity testing of protein fraction that showed an ability to cleave supercoiled double stranded DNA revealed that RIPs eluated at NaCl gradient of 0.33-0.37 M and 0.38-0.41 M, concentration of 0.553 mg/mL rrelatively less toxic against HeLa cell culture with percentage of cytotoxicity of 29,53%.

Keywords: *Mirabilis jalapa* L., RIPs, cytotoxicity

Pendahuluan

Kanker merupakan suatu penyakit sel, dengan ciri adanya gangguan atau kegagalan mekanisme pengatur multiplikasi dan fungsi homeostatis lainnya pada organisme multiseluler. Di negara maju yang telah berhasil membasmi penyakit infeksi, kanker merupakan penyebab kematian kedua, setelah penyakit kardiovaskuler (Heyzer *et al.*, 1987).

Saat ini, telah banyak dikembangkan senyawa kimia baru yang ditelusuri dari bahan alam, yang secara tradisional dikenal berkhasiat sebagai obat. Salah satu senyawa bioaktif dari tanaman yang diindikasikan sebagai antikanker adalah *Ribosome Inactivating Proteins* (RIPs). Terdapat 2 tipe RIPs yaitu RIPs tipe 1 dan tipe 2. RIPs merupakan protein toksik dari tanaman dengan aktivitas RNA N-glikosidase yang mampu mendepurinasi rRNA sehingga bisa merusak ribosom dan menghentikan sintesis protein. Selama ini, RIPs diketahui memiliki beberapa aktivitas biolois antara lain aktivitas immunosupresif, abortifacient, anti-viral, sitotoksitas pada sel mamalia dan aktivitas pemotongan DNA superkoil untai ganda. Ketertarikan pada RIPs dewasa ini

meningkat, karena potensinya untuk dirakit menjadi suatu imunotoksin sehingga dapat dikembangkan sebagai antikanker (Barbieri *et al.*, 1993).

Vivanco *et al.* (1999) melaporkan bahwa akar dan daun *Mirabilis jalapa* L yang terdapat di Peru mengandung protein antiviral yang aktif melawan transmisi mekanik *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) pada tembakau, tomat dan lada. Protein tersebut termasuk RIPs tipe 1 yaitu *Mirabilis Antiviral Protein* (MAP). MAP juga terbukti mampu menghambat sintesis protein *Escherichia coli* sama baiknya seperti hambatannya pada sel eukariota (Habuka *et al.*, 1999). Berdasarkan penelitian sebelumnya, diketahui bahwa fraksi protein hasil dialisis dari ekstrak daun *Mirabilis jalapa* L. mampu memotong DNA superkoil untai ganda menjadi *nicked circular* dan linier serta bersifat sitotoksik terhadap kultur sel HeLa (Elly, 2000) dan kultur sel Raji (Sari, 2002). Protein murni dari daun *Mirabilis jalapa* L. yang diperoleh melalui pengendapan bertingkat dengan amonium sulfat dan dilanjutkan dengan kromatografi penukar kation menggunakan kolom *CM Sepharose Cl-6B* diketahui mempunyai

aktivitas memotong DNA superkoil pUC18 (Herawati, 2002) dan aktivitas N-glikosidase terhadap *Saccharomyces cerevisiae* (yeast) (Prasetyowati, 2002). Akan tetapi belum diketahui apakah protein hasil pemurnian tersebut mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel HeLa. Dalam penelitian ini dilakukan pemurnian dengan kromatografi penukar kation menggunakan kolom *CM Sepharose CL-6B* untuk menentukan protein spesifik yang memiliki aktivitas mirip RIPs dan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel HeLa.

Metode Penelitian

Bahan Penelitian

Semua bahan kimia yang digunakan mempunyai kualitas pro analisis. Bahan tanaman yang digunakan adalah daun *Mirabilis jalapa* L. segar, varietas bunga merah keunguan yang tumbuh di daerah Samirono, Sleman Yogyakarta. Determinasi daun *Mirabilis jalapa* L. telah dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta.

Bahan untuk ekstraksi dan pemurnian: natrium fosfat, NaCl, ammonium sulfat dan CM Sepharose CL-6B. Bahan untuk uji aktivitas pemotongan DNA superkoil untai ganda: Agarosa (Gibco BRL), larutan TBE 5X: tris borat 0,445M, asam borat 0,445 M, EDTA 0,01M pH 8,0; ethidium bromida (Sigma); dapar pemuat: silensilanol (Sigma) 0,25% v/v, biru brom fenol (Sigma) 0,25% v/v, gliserol 30% v/v; larutan dpar TMN: tris klorida 50 mM pH 8,0, magnesium klorida 10 mM dan NaCl 100 mM. Bahan untuk uji sitotoksisitas: kultur sel HeLa diperoleh dari stok Laboratorium Ilmu Hayati UGM; media RPMI 1640: RPMI 1640 (Sigma), natrium bikarbonat dan hepes; Media kultur sel: media RPMI 1640, Fetal bovine serum (Gibco) 10% v/v, penisilin-streptomisin (Gibco 1% v/v dan fungison (Gibco) 0,5% (v/v); MTT; reagen stopper: natrium dodesil sulfat 10% v/v dalam HCl 0,01 N.

Alat Penelitian

Alat-alat gelas, bejana elektroforesis i-Mupid.J, incubator orbital shaker (LM-510R), vortex (Genie-2), pH meter (TOA), kolom (tipe C dimensi 1x20 cm, Pharmacia LKB Biotech), pompa (Perkin Elmer seri 200 LC Pump), detektor (Perkin Elmer UV LV 295), integrator (Perkin Elmer Nelson LC model 1022), injektor (perkin Elmer oven

101), 96-well plate, ELISA Reader SLT 340 ATC.

Langkah Penelitian

Isolasi DNA plasmid pUC18

Seratus il bakteri *Escherichia coli* DH5 α yang membawa plasmid pUC18 dalam gliserol 50% ditumbuhkan ke dalam 50 ml media LB cair yang mengandung ampisilin 100 μ g/ml media kemudian diinkubasi dalam *incubator orbital shaker* pada suhu 37°C selama semalam. Kultur hasil inkubasi disentrifugasi dengan kecepatan 2500xg selama 10 menit. Supernatan dibuang, pellet disuspensikan dalam 1,25 ml larutan Lisis I dingin dan digojog, didiamkan dalam es selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 2,5 ml larutan Lisis II yang dibuat baru (campuran NaOH 0,2 N dan SDS 2% sama banyak) dan digojog perlahan, didiamkan dalam es selama 5 menit. Setelah itu ditambahkan 1,875 ml larutan Lisis III dingin dan digojog, didiamkan dalam es selama 5 menit. Kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500xg selama 10 menit. Supernatan diambil, dipindahkan ke dalam tabung konikal steril, kedalamnya ditambahkan larutan pengekstraksi (terdiri dari campuran fenol : kloroform : isoamilalkohol = 25:24:1) sama banyak dengan volume supernatan. Selanjutnya divortex selama 1 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3500xg selama 10 menit. Fase cair paling atas diambil, dipindahkan ke dalam tabung konikal baru dan ditambah dengan kloroform sama banyak dengan volume supernatant, lalu divortex selama 1 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 3500xg selama 10 menit maka akan terbentuk dua fase yaitu fase air dan fase kloroform. Fase air dipisahkan dan dipindahkan ke dalam eppendorf masing-masing 500 μ l. Kemudian masing-masing eppendorf ditambahkan 50 μ l natrium asetat 3M pH 4,8 (1/10 x volume) dan etanol absolute sebanyak 1,0 ml (2xvolume). Kemudian didiamkan pada suhu -20°C. Setelah 1 jam disentrifugasi dengan kecepatan 12.000xg selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pellet dikeringkan dalam blower suhu 37°C selama 15 menit. Pellet yang telah dikeringkan dilarutkan dalam larutan TE pH 7,4 dan disimpan pada suhu 4°C semalam. Setelah itu dipindahkan dan disimpan pada suhu -20°C. DNA plasmid yang diperoleh dicek dengan

elektroforesis dalam agarosa 0,8% b/v. Delapan μ l (16,8 μ g) DNA plasmid pUC18 dan 2,0 μ l *loading buffer* dicampur dan dimasukkan ke dalam sumuran agarosa. Elektroforesis dilakukan dengan kekuatan 50 Volt selama 60 menit dengan menggunakan larutan dapar TBE 0,5x. RNA dihilangkan dengan cara ditambah RNase 10 μ g/ml sebanyak 1/10 x volume DNA plasmid pUC18 dan diinkubasi pada 37°C selama 1 jam.

Ekstraksi dan fraksinasi protein dari daun *Mirabilis jalapa* L.

Daun *Mirabilis jalapa* L. dikumpulkan segar, dicuci bersih dengan air mengalir, lalu dipotong kecil-kecil. Sebanyak 60 gram ditempatkan pada mortar steril, ditumbuk halus dengan penambahan 130 ml dapar natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M natrium klorida pada suhu 4°C. Supernatan pada suhu 4°C ditambah ammonium sulfat dengan kejenuhan 40% sambil diaduk dan didiamkan pada suhu 4°C selama 2 jam. Larutan disentrifugasi 3500xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan kemudian ditambah lagi ammonium sulfat sehingga mencapai kejenuhan 80%, didiamkan selama satu malam pada suhu 4°C. Larutan itu kemudian disentrifugasi pada 3500xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan dibuang dan endapan dilarutkan dalam sedikit mungkin dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5. Selanjutnya dilakukan dialisis semalam menggunakan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5. Cairan dialisis diganti 3-4 kali kemudian hasil dialisis disentrifugasi 3500xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Endapan dibuang dan supernatan merupakan sampel fraksi protein.

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

Satu ml fraksi protein hasil dialisis (21,51 mg) diinjeksikan ke dalam kolom yang telah diekuilibrasi dan dielusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 selama 30 menit dengan kecepatan alir 0,8 ml/menit. Fraksi protein dikoleksi setiap 2 menit dan ditampung ke dalam eppendorf. Protein yang terikat pada fase diam dielusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien selama 90 menit. Fraksi-fraksi protein yang ditampung diuji aktivitas

pemotongan DNA superkoil. Pengukuran kadar protein total dilakukan dengan cara mengambil sebanyak 20,0 μ l ekstrak gubal, fraksi protein 40% dan 80%, protein hasil dialisis dan fraksi protein hasil kolom, dan ditambahkan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 sampai volume 1,0 ml, kemudian diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 280 dan 260 nm menggunakan blanko dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5. Selanjutnya harga R280/260 diekstrapolasikan pada tabel untuk mengetahui besarnya faktor koreksi.

Kadar protein total (mg/ml) = A280 x faktor koreksi x faktor pengenceran

Uji aktivitas pemotongan DNA superkoil

Tiga μ l (6,3 μ g) DNA plasmid pUC18 dicampur dengan 2,5 μ l dapar TMN 10x pH 8,0 dan fraksi protein dengan kadar tertentu, ditambahkan aqua destilata hingga volume akhir 25,0 μ l, diinkubasi pada suhu 30°C selama satu jam. Kemudian ditambahkan 2,0 μ l dapar pemuat (*loading buffer*) dan dielektroforesis menggunakan gel agarosa 0,8% yang mengandung pewarna ethidium bromida dengan kekuatan 50 Volt selama 80 menit menggunakan dapar TBE 0,5x. Pengamatan dilakukan dibawah sinar UV.

Uji sitotoksitas menggunakan metode MTT

Sel HeLa didistribusikan ke dalam sumuran dan diinkubasikan bersama fraksi protein dengan satu seri kadar selama 24 jam. Pada akhir inkubasi, kepada masing-masing sumuran ditambahkan 10 μ l MTT 5 mg/ml dalam medium RPMI. Kemudian diinkubasi lagi selama 4 jam pada suhu 37°C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk warna ungu. Reaksi MTT dihentikan dengan pereaksi penghenti (stopper) sebanyak 100 μ l dan diinkubasikan semalam pada suhu kamar. Serapan dibaca dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm.

Analisis Data

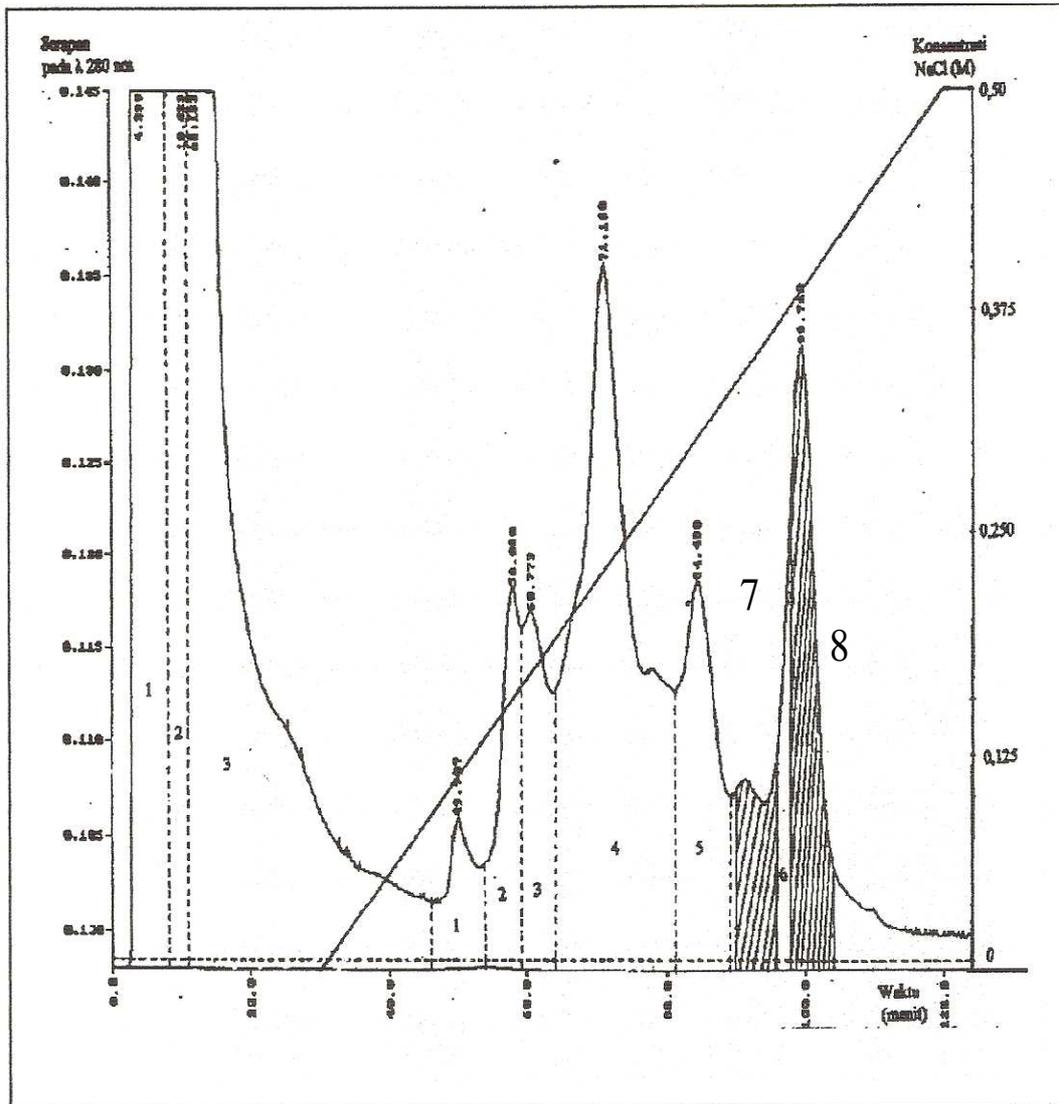
Persentase kematian sel merupakan selisih jumlah sel kontrol dengan jumlah sel perlakuan dibagi dengan jumlah sel kontrol dikalikan 100%

Hasil Penelitian

Proses ekstraksi daun segar *M. jalapa* L. dengan natrium fosfat 5 mM pH 7,2 yang mengandung 0,14 M natrium klorida pada

suhu 4°C menghasilkan sekitar 155,5 ml ekstrak gubal. Berdasarkan perhitungan, kadar protein ekstrak gubal yang diperoleh sebesar 76,26 mg/ml sehingga jumlah protein total ekstrak gubal sebesar 11858,43 mg (19,76% protein dari 60 gram daun). Kadar protein hasil pengendapan dengan ammonium sulfat sampai kejenuhan 40% sebesar 44,91 mg/ml sedangkan kadar protein pada supernatan setelah penambahan ammonium sulfat sampai kejenuhan 80% sebesar 8,9 mg/ml.

kation menggunakan kolom CM Sepharose CL-6B dan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 selama 30 menit dengan kecepatan alir 0,8 ml/menit dilanjutkan elusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien selama 90 menit. Profil kromatogram ditunjukkan pada gambar 1. Fraksi protein yang terelusi dengan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5



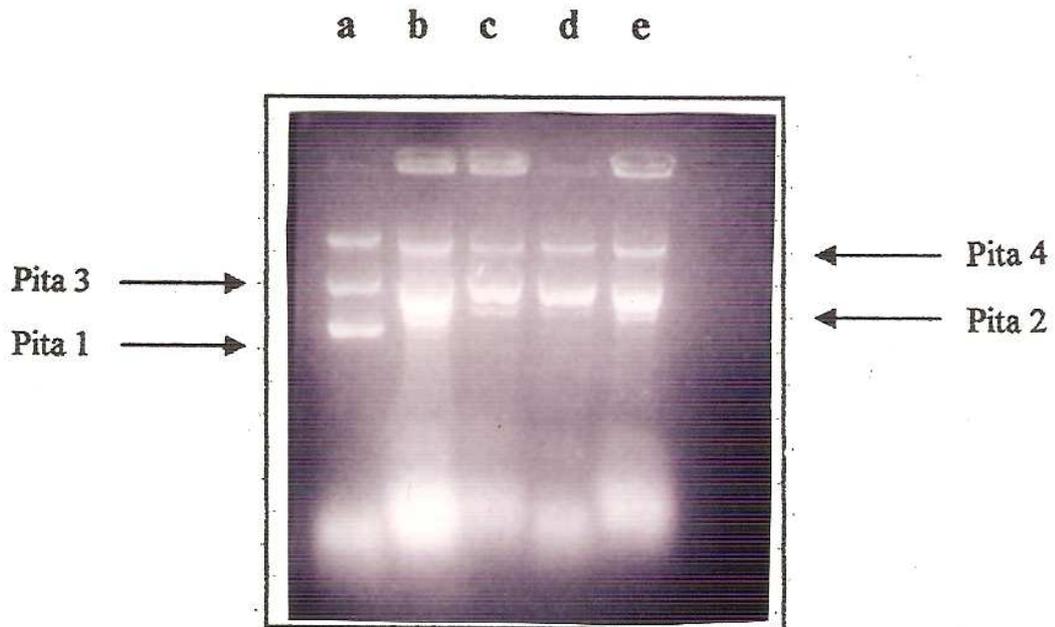
Gambar 1. Profil elusi kromatografi dengan kolom CM Sepharose CL-6B, fraksi dikoleksi setiap 2 menit. Daerah yang diarsir (fraksi 46-48) dan fraksi 50-52) menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil

Kadar protein hasil dialisis sebesar 12,51 mg/ml, volume sekitar 14 ml sehingga jumlah protein total sebesar 301,14 mg. Fraksi protein hasil dialisis selanjutnya dimurnikan dengan kromatografi penukar

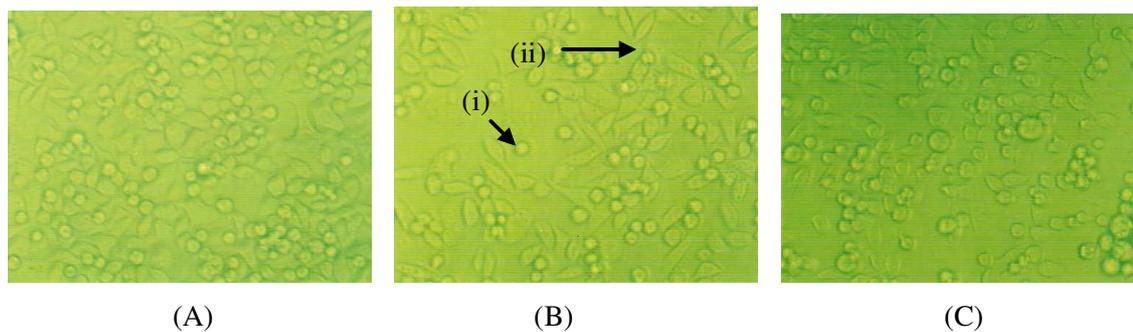
selanjutnya disebut fraksi protein tidak terikat fase diam dan fraksi protein yang terelusi dengan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien disebut fraksi protein terikat fase diam.

Fraksi protein yang keluar pada puncak yang sama pada kromatogram digabungkan. Dari hasil penggabungan, diperoleh 3 fraksi mayor yang tidak terikat fase diam dan 8 fraksi mayor yang terikat fase diam. Terhadap fraksi-fraksi yang ditampung selanjutnya dilakukan uji aktivitas pemotongan DNA superkoil.

protein tersebut terelusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 pada gradien NaCl 0,33-0,37 M. Selain itu juga diperoleh 2 fraksi mayor yang tidak terikat pada fase diam yang menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil yaitu fraksi 2 dan fraksi 3 (gambar tidak ditampilkan).



Gambar 2. Elektroforegram hasil uji aktivitas pemotongan DNA superkoil fraksi protein hasil pemurnian dengan kolom CM Sepharose CL-6B yang terikat fase diam. Pita 1: pita DNA superkoil, pita 2: pita DNA linier, pita 3: pita DNA nicked circular, pita 4: pengotor. Lajur a: DNA plasmid pUC18 utuh (kontrol negatif), b dan d: fraksi 7 (72 μ g), c dan e: fraksi 8 (72 μ g).



Gambar 3. Gambaran perubahan morfologi sel HeLa setelah diberi perlakuan dengan fraksi protein hasil pemurnian dengan kolom CM Sepharose CL-6B terikat fase diam yang memiliki aktivitas pemotongan DNA superkoil pada kultur sel HeLa dengan waktu inkubasi selama 24 jam (A) kontrol negatif, (B) kadar protein 0,553 mg/mL, dan (C) kadar protein 0,004 mg/mL. (i) Sel mati, (ii) Sel hidup

Berdasarkan hasil uji aktivitas pemotongan DNA superkoil, diperoleh 2 fraksi mayor yang terikat pada fase diam yang menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil yaitu fraksi 7 dan fraksi 8 seperti ditunjukkan pada gambar 2. Fraksi

Selanjutnya dilakukan uji sitotoksitas fraksi-fraksi protein yang diperoleh pada kultur sel HeLa. Hasil uji sitotoksitas fraksi protein tersebut ditunjukkan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil uji sitotoksitas

fraksi protein dari daun *M. jalapa* L pada kultur sel HeLa dengan waktu inkubasi 24 jam seperti ditunjukkan pada tabel 1, dapat dilihat bahwa persentase kematian sel HeLa baik pada fraksi protein dialysis, fraksi protein tidak terikat fase diam dan fraksi protein yang terikat pada fase diam yang terelusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 pada gradien NaCl 0,33-0,37 M tidak terlalu besar (kurang dari 50% kematian sel).

Pembahasan

Berdasarkan data hasil penelitian ini, kadar protein tertinggi adalah pada ekstrak gubal yang disebabkan karena proteinnya masih bercampur dan belum dipisahkan. Protein pada ekstrak gubal dipisahkan lebih lanjut dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat, dilanjutkan dengan dialysis dan pemisahan dengan kromatografi penukar kation menggunakan kolom CM Sepharose CL-6B dan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 selama 30 menit dengan kecepatan alir 0,8 ml/menit dilanjutkan elusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien selama 90 menit. Dari hasil uji aktivitas pemotongan DNA superkoil diketahui bahwa fraksi protein terikat fase diam yang terelusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 pada gradien NaCl 0,33-0,37 M (fraksi 7 dan 8) menunjukkan aktivitas pemotongan DNA superkoil secara sempurna, dimana DNA superkoil berubah menjadi bentuk DNA linier dan *nicked circular*. Data tersebut menunjukkan bahwa fraksi protein 7 dan 8 yang terikat fase diam memiliki aktivitas biologis sejenis RIPs karena mampu memotong DNA superkoil untai ganda menjadi bentuk *nicked circular* dan linier. Barbieri *et al.* (1993) melaporkan bahwa RIPs tipe 1 dimurnikan dengan kromatografi penukar kation dengan fase diam derivat CM (carboxymethyl) atau sulfopropil karena RIPs tipe 1 mempunyai titik isoelektrik (pI) pada daerah alkali, biasanya = 9,5. MAP yang merupakan RIPs tipe 1 memiliki titik isoelektrik 9,8 (Kubo *et al.*, 1990). Oleh karena itu, pada pemurnian fraksi protein dari daun *M. jalapa* L. Menggunakan fase diam CM Sepharose CL-6B dan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5, protein-protein yang mempunyai pI lebih besar daripada pH larutan akan bermuatan positif. Dengan adanya gugus karboksilat pada CM Sepharose

CL-6B maka semua protein yang bermuatan positif akan terikat pada fase diam yang bermuatan negatif tersebut. Sedangkan protein-protein yang bermuatan negatif tidak akan berikatan dengan fase diam dan langsung terelusi keluar dari kolom.

Fraksi protein hasil pemurnian tersebut selanjutnya diuji aktivitas sitotoksiknya pada kultur sel HeLa dengan waktu inkubasi 24 jam. Data hasil uji sitotoksitas pada sel HeLa seperti tercantum pada tabel 1 menunjukkan bahwa persentase kematian sel HeLa setelah pemberian fraksi protein relatif kecil yang menunjukkan bahwa fraksi protein dialysis, fraksi protein tidak terikat fase diam dan fraksi protein terikat fase diam dengan kadar 0,553 mg/mL relatif tidak toksik terhadap sel HeLa pada waktu inkubasi 24 jam. Diantara ketiga fraksi protein tersebut, fraksi protein hasil pemurnian yang terikat pada fase diam dan terelusi pada gradien NaCl 0,33-0,37 M dan 0,38-0,41 M menunjukkan aktivitas sitotoksik paling tinggi dengan persentase kematian sel HeLa sebesar 29,23%. Hal ini kemungkinan disebabkan karena fraksi ini hanya mengandung protein yang benar-benar aktif. Gambaran morfologi sel HeLa setelah pemberian fraksi protein terikat fase diam yang terelusi pada gradien NaCl 0,33-0,37 M dan 0,38-0,41 M (gambar 3) menunjukkan bahwa pada pemberian protein dengan kadar 0,553 dan 0,004 mg/mL populasi sel HeLa yang hidup lebih sedikit dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun fraksi protein tersebut dengan kadar tertinggi 0,553 mg/mL relatif tidak toksik terhadap sel HeLa, tetapi terjadi penghambatan proliferasi sel HeLa.

Kesimpulan

1. Fraksi protein yang memiliki aktivitas sejenis RIPs, yang dimurnikan dari daun *Mirabilis jalapa* L. dengan kromatografi penukar kation menggunakan kolom CM Sepharose CL-6B, menggunakan fase gerak dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 selama 30 menit dengan kecepatan alir 0,8 ml/menit dilanjutkan elusi dengan dapar natrium fosfat 5 mM pH 6,5 yang mengandung natrium klorida 0,5 M secara bergradien selama 90 menit, terelusi pada gradien natrium klorida 0,33 - 0,37 M dan 0,38 - 0,41 M
2. Fraksi protein aktif sejenis RIPs hasil pemurnian dengan kolom CM Sepharose

CL-6B pada kadar 0,553 mg/ml, bersifat relatif tidak toksik terhadap kultur sel HeLa dengan persentase kematian sel HeLa sebesar 29, 53%.

Activity of MAP-Containing Extract from *Mirabilis jalapa* L. roots, *Plant Dis*, **83**, 1116-1121

Pustaka

- Barbieri, L., Batteli, M.G., Stirpe, F. (1993) Ribosome Inactivating Protein from Plants, *Biochem et Biophysica Acta*, 405-410
- Elly, W. (2002) *Efek Fraksi Protein yang Diisolasi dari Daun Mirabilis jalapa L. terhadap Proses Apoptosis pada Sel HeLa*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Habuka, N., Murakami (1991) Amino Acid Sequence of MAP, Total Synthesis of Gene an Expressionin E. coli, *Journal Biol. Chem*, 264
- Herawati, T. (2002) Pemurnian Ribosome Inactivating Protein (RIP) dari Daun *Mirabilis jalapa* L. Bunga Merah menggunakan Kolom Sephacryl S-300 HR. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Heyzer, E.G., Gan, Sulistia, Nafrialdi (1987) Antikanker, in Sulistia Gan *et al.*, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi III, Fakultas Kedokteran Umum Universitas Indonesia, Jakarta, 624-625
- 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
- Prasetyowati, A.T., 2002, *Uji Aktivitas N-Glikosidase Daun Bunga Pukul Empat (Mirabilis jalapa L.) Bunga Merah dari Hasil Pemurnian dengan Kromatografi Kolom CM Sepharose*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Sari, R.P., 2002, *Efek Fraksi Protein Sejenis Ribosome Inactivating Proteins (RIP) yang Diisolasi dari Akar Mirabilis jalapa L. terhadap Proses Kematian Sel Raji*, Skripsi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
- Vivanco, J.M., Qurci, M., Salazai, L.F., 1999, Antiviral and Antiviroid