

Karakteristik dan Peran Protein Ikat Folat (PIF)

Subandrate^{1*}, Dwirini Retno Gunarti², Mohamad Sadikin²

¹Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Sriwijaya, Jl. Dr. M. Ali Komp. RSMH KM 3,5 Palembang

²Departemen Biokimia dan Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jl. Salemba Raya 6 Jakarta

*E-mail: subandrate@unsri.ac.id

Abstrak

Asam folat merupakan kelompok vitamin B. Asam folat terikat dengan suatu protein yang disebut protein ikat folat (PIF). PIF merupakan suatu glikoprotein dengan 222 residu asam amino dan berat molekul sekitar 31000 Dalton. Struktur tiga dimensi PIF dipertahankan oleh enam sampai delapan jembatan disulfida. PIF memiliki kemampuan mengikat asam folat dengan perbandingan ikatan 1:1 mol. Situs aktif PIF mengandung gugus imidazol atau gugus sulfhidril. Kofaktor ion kalsium tidak dibutuhkan PIF dalam mengikat asam folat. Di dalam tubuh, PIF berperan menghimpun, mengangkut, dan membantu penyimpanan, penggunaan serta pendistribusian asam folat ke jaringan. PIF juga berperan mengurangi ekskresi asam folat di ginjal dan meningkatkan penyerapan asam folat di intestinum. Dalam bidang kedokteran PIF dapat dimanfaatkan untuk mengukur kadar asam folat serum dengan metode analog ELISA.

Kata kunci: Asam Folat, Protein Ikat Folat, Stuktur Tiga Dimensi, Situs Aktif

Abstract

Characteristic and role of folate binding protein. Folic acid is a group of B vitamin bound to a protein called folate binding protein (FBP). FBP is a glycoprotein with 222 amino acid residues and a molecular weight of about 31000 Dalton. FBP's three-dimensional structure maintained by six to eight disulfide bridges. FBP has the binding ability of folic acid by ratio of 1: 1 mol. Active sites of FBP containing imidazole groups or sulfhydryl groups. Cofactor, Calcium ion, is not required FBP in binding of folic acid. In the body, FBP collect, transport and help storage, utilization and distribution folic acid to other tissues. FBP also contribute to decrease of folic acid excretion in the kidneys and increase the absorption of folic acid in the intestine. In the medicine, FBP can be used to measure serum levels of folic acid by ELISA-analog method.

Keywords: Folic Acid, Folate Binding Protein, 3D Structure, Active Site

Pendahuluan

Asam folat merupakan kelompok vitamin B. Vitamin ini terbentuk dari tiga komponen yang berbeda yaitu derivat pteridin, p-aminobenzoat dan satu atau lebih glutamat. Asam folat mempunyai peran yang penting dalam tubuh. Tetrahidrofolat merupakan suatu koenzim yang diperlukan dalam proses transfer gugus metil, metilen, metenil, formil dan formimino pada metabolisme asam amino. Transfer

gugus-gugus dengan satu atom karbon tersebut melalui atom N-5 dan atau N-10^{1,2}. Selain itu, tetrahidrofolat berperan dalam sintesis asam nukleat untuk membentuk timidin dan purin¹⁻³.

Defisiensi asam folat menyebabkan gangguan pada proses metabolisme asam amino dan sintesis asam nukleat. Sebaliknya, fortifikasi folat yang berlebihan juga dapat meningkatkan risiko atau progresivitas keganasan tertentu^{1,4-7}.

Di dalam susu murni, asam folat berikatan dengan suatu protein yang disebut protein ikat folat (PIF). Protein ini juga terdapat di dalam makanan, lambung, darah, dan hampir semua jaringan dengan konsentrasi yang berbeda-beda dalam keadaan terikat dengan asam folat maupun bebas⁸⁻¹⁰. Namun, susu merupakan sumber PIF yang utama dan mudah didapat. Protein ini diduga berfungsi untuk menstabilkan asam folat^{5,11-14}.

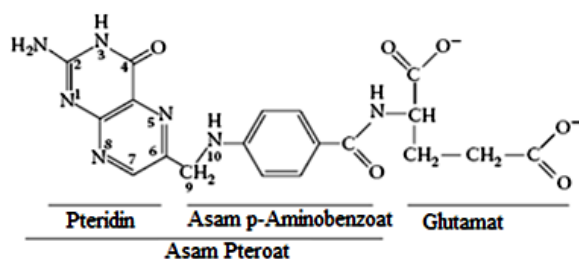
PIF pertama kali diamati oleh Ghitis pada tahun 1967. Ghitis menemukan bahwa protein ini berikatan secara kuat dan spesifik dengan asam folat dalam susu^{6,11,13,14}. Adanya penemuan PIF membuka perkembangan baru dalam bidang kedokteran mengenai peran dan fungsi PIF dalam tubuh manusia. Selain itu, penemuan ini juga membuka kemungkinan pemanfaatan PIF sebagai biomarker yang dapat digunakan untuk mengukur kadar asam folat serum sehingga tercipta suatu metode pengukuran asam folat yang lebih murah dan sederhana.

Tulisan ini akan membahas tentang struktur, peran dan pemanfaatan PIF dalam dunia kedokteran.

Pembahasan

1. Asam Folat

Asam folat merupakan kelompok vitamin B. Vitamin ini pertama kali ditemukan pada tahun 1941 oleh Mitchell dan kawan-kawan^{10,15,16}. Asam folat (*pteroylmonoglutamate*) terbentuk dari tiga komponen yang berbeda yaitu derivat pteridin, p-aminobenzoat dan glutamate (Gambar 1). Glutamat yang terdapat dalam asam folat dapat berjumlah sampai dengan delapan residu^{1,2,15}.



Gambar 1. Struktur Asam Folat¹⁵

Dalam tubuh bentuk aktif asam folat adalah tetrahidrofolat (THF atau H₄ folat). THF dibentuk oleh enzim dihidrofolat reduktase dari asam folat langsung atau melalui pembentukan dihidrofolat dahulu. Reaksi ini menambahkan residu glutamat melalui ikatan peptida dan menambahkan unit karbon tunggal pada posisi N5 dan atau N10 secara reduksi atau oksidasi. Proses reduksi THF menjadi berbagai derivat asam folat ini melibatkan berbagai macam asam amino. Ada lima unit karbon tunggal yang dapat terikat pada posisi N5 dan atau N10 ini, yakni metil, formil, formimino, metilen, dan metenil. Bentuk aktif asam folat, THF, berguna sebagai donor unit karbon tunggal untuk berbagai metabolisme tubuh^{1,15-19}.

Asam folat banyak terdapat dalam tumbuh-tumbuhan seperti sayur-sayuran hijau, biji-bijian, kacang-kacangan, tanaman polong-polongan dan sari jeruk. Pada hewan, asam folat banyak terdapat dalam susu dan hati. Di dalam makanan, asam folat terdapat dalam bentuk poliglutamat^{15,17-19}. Asam folat diperlukan oleh tubuh dalam jumlah yang optimal supaya tidak kekurangan dan kelebihan. Asam folat serum dipertahankan normal dengan jumlah 6-20 mg/dl. WHO menganjurkan untuk mengonsumsi makanan yang mengandung asam folat secara optimal guna mencegah penyakit yang disebabkan oleh defisiensi atau kelebihan asam folat²⁰⁻²³.

2. Protein Ikat Folat

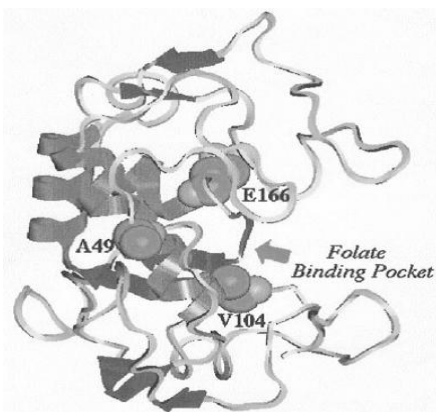
Protein ikat folat (PIF) atau disebut juga reseptor folat (RF) merupakan suatu protein yang dikode oleh gen pada kromosom 11q13. PIF adalah glikoprotein^{6,11,15}. Protein ini pertama kali ditemukan oleh Ghitis pada tahun 1967 sebagai suatu makromolekul pada susu sapi yang berikatan kuat dan spesifik dengan folat^{4,17,28}.

a. Struktur PIF

PIF di dalam susu sapi mengandung 222 residu asam amino dan mempunyai enam atau delapan jembatan disulfida. Selain itu, protein

ini juga mengandung glukosa, gula amino, dan asam sialat. Protein ini memiliki berat molekul bervariasi 25.000-35.000 Dalton. Svendsen mengatakan bahwa PIF dari susu sapi memiliki berat molekul 25.700 Dalton, sedangkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Salter menunjukkan bahwa berat molekul PIF adalah 30.000-35.000 Dalton. Nygren dan Subandrate dkk mengatakan berat molekul PIF sekitar 31.000 Dalton^{4,6,14,29-31}.

PIF dari susu sapi memiliki sekuen asam amino yang mirip dengan sekuen asam amino protein ikat riboflavin (PIR) ayam. Semua residu triptofan dan 16 residu sistein pada PIF juga terdapat pada PIR. Hal ini menunjukkan bahwa ada kemiripan struktur dan fungsional antara PIF dan PIR. Pada PIR, semua residu sistein dan beberapa residu triptofan berada di sekitar *ligand-binding domain*. Dengan demikian, ada kemungkinan daerah ikatan antara PIF dengan folat juga berada pada posisi asam amino tersebut, karena folat juga memiliki struktur yang mirip dengan riboflavin yakni sama-sama memiliki cincin aromatik hidrofobik (Gambar 2). Penelitian yang dilakukan oleh Subandrate dkk (2012) menyebutkan bahwa gugus aktif PIF mengandung gugus imidazol atau sulfhidril. Selain itu, jembatan sulfida pada PIF penting untuk menjaga struktur tiga dimensi agar PIF dapat mengikat Folat. Keberadaan ion kalsium sebagai kofaktor tidak dibutuhkan PIF untuk mengikat folat^{6,17,32-34}.



Gambar 2. Model Struktur PIF Berdasarkan Kemiripan dengan PIR³⁴

PIF bersifat negatif pada pH netral dan larut dalam susu dan cairan tubuh lain dan tahan terhadap enzim-enzim pencernaan. PIF dari sapi dan manusia mempunyai afinitas yang konstan terhadap folat. Derajat disosiasi ikatan antara PIF dengan folat adalah 10^{-9} - 10^{-10} M dan perbandingan ikatan PIF dengan folat secara stoikiometri adalah 1:1 mol²⁹⁻³³.

Ada beberapa penelitian menyatakan bahwa PIF mempunyai tiga bentuk protein yang homolog yakni RF- α , RF- β , dan RF- γ . RF- α dan RF- β menempel pada membran sel melalui ujung glikosil-fosfatidilinositol dan dapat dilepaskan dari membran sel oleh fosfolipase C, sedangkan RF- γ disekresikan ke sirkulasi. PIF pada susu sapi kemungkinan mirip dengan RF- α ^{6,15}.

b. Sumber PIF

PIF dapat diisolasi dari susu sapi, susu kambing, susu manusia, serum normal, urin, cairan asites dan amnion, serta sel kanker. Isolasi PIF dari susu sapi berhasil dilakukan oleh Salter pada tahun 1972 dan isolasi PIF dari *whey* berhasil dilakukan oleh Svendsen pada tahun 1979. Pada tahun 1977 Rubinoff berhasil mengisolasi PIF dari susu kambing. Isolasi PIF dari susu manusia dilakukan oleh Waxman dan Schreiber pada tahun 1975. Holm dan Hansen berhasil mengisolasi PIF dari serum babi^{4,13,29,30}.

Kadar PIF dari susu sapi segar lebih kurang 21 nmol/100 g, sedangkan dalam susu yang mengalami pasteurisasi dan proses *ultra high temperature* masing-masing sebanyak 16,8 nmol/L dan 1 nmol/L. Dalam susu manusia kadar PIF ini adalah sekitar 0,38 μ g/L, sedangkan kadar PIF dalam serum babi adalah 50-100 nM. Pengukuran kadar PIF dapat dilakukan dengan ELISA atau *optical biosensor*^{4,6,10,17,28,30}.

c. Peran PIF

Peran PIF masih belum diketahui dengan pasti. Di dalam susu, PIF hanya menjamin folat tetap berada dalam susu dengan mengikat THF dan 5-metil THF. Fork menduga peran

PIF dalam susu manusia adalah sebagai bahan untuk menghimpun folat dari plasma darah ke dalam susu di kelenjar payudara. Dengan kata lain, PIF berperan dalam utilisasi dan penyimpanan serta pengangkutan folat dalam tubuh. Peran ini menjadi sangat penting karena terkait dengan peran asam folat dalam metabolisme tubuh seperti telah diuraikan di atas^{6,17,29}.

Menurut Parodi, fungsi biologis PIF adalah untuk mengikat folat disirkulasi dan menransfer folat ke jaringan serta menurunkan ekskresi folat di ginjal. *International Dairy Federation* mengatakan bahwa PIF dapat menghambat kolonisasi bakteri di saluran cerna dengan cara mengikat folat bebas yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri. Peran lain PIF dalam metabolisme asam folat masih belum diketahui^{5,6,35,36}.

d. Pemanfaatan PIF untuk Mengukur Kadar Asam Folat

Dari hasil uraian di atas diketahui bahwa PIF memiliki kemampuan untuk mengikat asam folat secara kuat dan spesifik. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ghitis dan Subandrate dkk, PIF mampu mengikat asam folat dengan perbandingan 1:1 mol. Atas dasar tersebut maka PIF berpotensi untuk dapat digunakan dalam mengukur kadar asam folat serum^{6,33}.

Pada saat ini teknik pengukuran asam folat yang sering digunakan adalah secara mikrobiologi, *radioassay*, HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), dan *immunoluminescent*. Namun, pengukuran asam folat dengan teknik-teknik di atas terbilang mahal dan mempunyai permasalahan tersendiri⁸⁻¹⁰.

Mardiana (2005) mencoba menggunakan PIF yang diisolasi dari susu sapi murni untuk mengukur kadar asam folat serum. Teknik yang digunakannya adalah teknik yang analog dengan ELISA (*Enzyme-Link Immunosorbent Assay*) yaitu *enzyme labeled protein ligand binding assay*. Penelitian yang dilakukan Mardiana menunjukkan bahwa PIF yang diisolasi dari susu sapi murni dapat

digunakan untuk mengukur kadar asam folat serum. Hanya saja PIF yang diperoleh tidak murni sehingga hasil pengukuran belum begitu akurat bila dibandingkan dengan pengukuran standar^{9,10}.

Pengukuran asam folat dengan PIF lebih sensitif dibandingkan dengan metode standar. Hal ini bisa dilihat dari tabel 1, kadar asam folat yang diukur dengan PIF lebih tinggi daripada kadar asam folat yang diukur dengan metode standar. Kadar asam folat yang bisa diukur hingga kadar 26,4 ng/mL, dimana dengan metode standar kadar tersebut tak terdeteksi^{9,10}. Penelitian yang dilakukan oleh Mardiana ini membuka cakrawala baru di dunia kedokteran untuk dikembangkan menjadi teknik yang murah dan sederhana dalam menentukan asam folat serum

Tabel 1 Hasil Pengukuran Asam Folat Serum dengan PIF yang Diisolasi dari Susu Sapi¹⁰

Serum	Pengukuran Standar (ng/mL)	Pengukuran PIF (ng/mL)
1	-	26,4
2	19,4	55,4
3	18,2	31,4
4	20,7	86,4

Kesimpulan

PIF merupakan glikoprotein dengan berat molekul sekitar 31000 Dalton dan memiliki 222 residu asam amino. Keberadaan struktur tiga dimensi dan situs aktif penting bagi PIF untuk menjalankan fungsinya dalam penggunaan asam folat. PIF dapat dimanfaatkan untuk pengembangan teknik pengukuran asam folat serum.

Daftar Acuan

1. Murray RK, Grannu DK, Mayes PA, Rodwell VW (editor). *Harper's illustrated biochemistry*. Edisi ke-27. New York: McGraw-Hill. 2006. p516-7
2. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. Edisi keempat.

- p672-83. Diunduh dari: www.whfreeman.com/lehninger4e.com
3. Koolman J, Roehm KH. Color atlas of biochemistry. Edisi kedua. Thieme Stuttgart: New York; 2005. p366
 4. Svendsen IB, Martin B, Pedersen TG, Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. Isolation and characterization of the folate-binding protein from cow's milk. *Carlsberg Res. Commun.* 1979; 44: 89-99
 5. Verwei M, Arkbåge K, Mocking H, Havenaar R, Gr J. The binding of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate to folate-binding proteins during gastric passage differs in a dynamic in vitro gastrointestinal model. *J. Nutr.* 2004; 134: 31-7
 6. Babol NL. Folate binding protein in bovine milk: occurrence and properties studied with surface plasmon resonance. Tesis Doktor. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 2007
 7. Kim YI. Will mandatory folic acid fortification prevent or promote cancer? *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1123-8.
 8. Sralsjo L, Arkbage K, Witthoft C, Jagerstad M. Evaluation of a radioprotein binding assay (RPBA) for folate analysis in berries and milk. *Food Chemistry.* 2002; 709:525-34
 9. Sadikin M, Mardiana, Harahap IP. Folic acid technique by protein-ligands binding metode using folate binding protein from cow's milks as binder protein. *Dipresentasikan pada The 4th Indonesian Biotechnology Conference.* Bogor. 2008
 10. Mardiana. Penggunaan protein ikat folat dari susu sapi untuk mengukur kadar folat serum. Tesis Magister Biomedik. Jakarta: Universitas Indonesia; 2005
 11. Nygren L, Sternesjo A, Bjorck L. Determination of folate-binding proteins from milk by optical biosensor analysis. *International Dairy Journal.* 2003; 13: 283-90
 12. Nixon P, Jones M, Winzor DJ. Quantitative Description of the interaction between folate and the folate-binding protein from cow's milk. *Biochem. J.* 2004; 382: 215-21
 13. Holm J, Hansen SI. Ligand binding and polymerization characteristics of human milk folate binding protein depend on concentration of purified protein and presence of amphiphatic substances. *Bioscience Reports.* 2003. 23(2&3)
 14. Holm J, Hansen SI. Binding of radiolabeled folate and 5-methyltetrahydrofolate to cow's milk folate binding protein at ph 7.4 and 5.0. relationship to concentration and polymerization equilibrium of the purified protein. *bioscience reports.* 2001; 21(6)
 15. Bailey LB (editor). Folate in health and disease. Edisi kedua. Boca Roton: CRC Press; 2010
 16. Sigma-Aldrich. Folic acid metabolism: a role in cancer's cause and cure. *Biofiles.* 5 (6): 24-9.
 17. Arkbåge K. Vitamin B12, folate and folate-binding proteins in dairy products: analysis, process retention and bioavailability. Tesis Doktor. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 2003
 18. Brody T. Nutritional biochemistry. Edisi kedua. California: Academic Press. 1998. p493-516
 19. Gregory III JF. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. *Advances in food and nutrition research.* 1989; 33
 20. Shane B. Folate fortification: enough already? *Am J Clin Nutr.* 2003;77:8-9
 21. Sauer J, Mason JB, Choi SW. Too much folate – a risk factor for cancer and cardiovascular disease? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Januari 2009; 12(1): 30-6
 22. Sweeney MR, McPartlin J, Scott J. Folic acid fortification and public health: report on threshold doses above which unmetabolised folic acid appear in serum. *BMC Public Health.* 2007; 7(41): 1-7

23. Purwani E, Zulaekah S. Risiko lahirnya bayi cacat pembuluh syaraf pada ibu hamil yang kekurangan asam folat. *Jurnal Kesehatan*. Juni 2008; 1(1):19-28
24. Albert CM, Cook NR, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E *et al*. Effect of folic acid and b-vitamins on risk of cardiovascular events and total mortality among women at high risk for cardiovascular disease: a randomized trial. *JAMA*. 7 Mei 2008; 299(17): 2027–36
25. Spiegelstein O, Cabrera RM, Bozinov D, Wlodarczyk B, Finnell RH. Folate-regulated changes in gene expression in the anterior neural tube of folate binding protein-1(folbp1)-deficient murine embryos. *Neurochemical Research*. Juni 2004; 6(29): 1105-12
26. Ashraf MJ, Cook JR, Rothberg MB. Clinical utility of folic acid testing for patients with anemia or dementia. *J Gen Intern Med*. 2008; 23(6):824–6
27. Henne WA, Doorneweerd DD, Lee J, Low PS, Savran C. Detection of folate binding protein with enhanced sensitivity using a functionalized quartz crystal microbalance sensor. *Analytical Chemistry*. 15 Juli 2006; 78: 4880-4
28. Holm J, Hansen SI. Characterization of a high affinity folate binding protein in porcine serum: ionic charge, concentration—dependent polymerization and ligand binding mechanism. *Bioscience Reports*. Oktober & Desember 2003; 23 (5&6).
29. Salter DN, Scott KJ, Slade H, Andrews P. The preparation and properties of folate-binding protein from cow's milk. *Biochem. J*. 1981; 193:469-76
30. Svendsen IB, Hansen SI, Holm J, Lyngbye J. The complete amino acid sequence of the folate-binding protein from cow's milk. *Carlsberg Res. Commun*. 1984; 49: 123-31
31. Holm J, Hansen SI, Hoier-Madsen M. ionic charge, hydrophobicity and tryptophan fluorescence of the folate binding protein isolated from cow's milk. *Bioscience Reports*. Juni 2001; 21(3).
32. Holm J, Hansen SI. Effect of hydrogen ion concentration and buffer composition on ligand binding characteristics and polymerization of cow's milk folate binding protein. *Bioscience Reports*. Desember 2001; 21(6)
33. Subandrate, Gunarti DR, Sadikin M. Properties of folate binding protein purified from cow's milk. *HAYATI Journal of Biosciences*. 2012;19(3): 105-109
34. Maziarz KM, Monaco HI, Shen F, Ratnam M. complete mapping of divergent amino acids responsible for differential ligand binding of folate receptors α and β . *Journal of Biological Chemistry*. April 1999; 274(16): 11086–91
35. Holm J, Hansen SI, Hoier-Madsen M, Bostad L. A high-affinity folate binding protein in proximal tubule cells of human kidney. *Kidney International*. 1992; 41: 50-5
36. Verwei M, Berg HVD, Havenaar R, Groten JP. Effect of folate-binding protein on intestinal transport of folic acid and 5-methyltetrahydrofolate across caco-2 cells. *Eur J Nutr*. 2005; 44: 242–9