

# ***ARTOCARPUS***

**Media Pharmaceutica Indonesiana**



ARTOCARPUS	Vol. 4	No. 2	Halaman 47 - 95	Surabaya September 2004	ISSN 1411-8734
------------	--------	-------	--------------------	----------------------------	-------------------

# **ARTOCARPUS**

**Media Pharmaceutica Indonesiana**

**Terbit setiap 6 bulan (Maret dan September)**

## **PENYUNTING AHLI :**

Prof. Nanizar Zaman Joenoes, Pharm.D. (Surabaya)  
Prof. Dr. Sutaryadi, Apt. (Surabaya)  
Prof. Dr. Oei Ban Liang (Bandung)  
Prof. Dr. dr. Hari Kustumandioko Lasmono, BA., MS. (Surabaya)  
Prof. Dr. Ami Soewandi, JS, Apt. (Surabaya)  
Prof. Dr. A. Aziz Hubeis, Apt. (Surabaya)  
Prof. Suwaldi Martodihardjo, Ph.D., MSc., Apt. (Yogyakarta)  
Prof. Dr. Lukman Hakim, MSc., Apt. (Yogyakarta)  
Prof. Dr. Ibnu Gholib Gandjar, DEA., Apt. (Yogyakarta)  
Prof. dr. Sofia Mubarika, M.Med.Sc., Ph.D (Yogyakarta)  
Dr. Wahono Sumaryono, APU, Apt. (Jakarta)  
Dr. L. Broto S. Kardono, Apt. (Serpong)  
Dr. Sudibyo Martono, MS., Apt. Yogyakarta)  
Dra. Indrajati Kohar, Ph.D. (Surabaya)

## **PENYUNTING PELAKSANA :**

### **Ketua :**

Drs. Tri Windono, MS.

### **Sekretaris :**

Drs. R. Soediatmoko Soediman, MSi.

### **Anggota :**

Drs. Ryanto Budiono, MSi.  
Dra. Ririn Sumiyani, MS.  
Dra. Lucia Endang Wuryaningsih, MSi.  
Dra. Endang Wahyuningsih, MS.  
Dra. Elisawati Wonohadi, MSi.

## **Administrasi & Sirkulasi :**

Asih Darni  
Sri Andriyani

## **Penerbit :**

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

## **Alamat Redaksi / Penerbit :**

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya  
Jalan Raya Kalirungkut Surabaya  
Telepon (031) 2981110, 2981112, 2981118, 8439277, Pesawat 1110, 1112, 1118  
Faksimile (031) 8439655, 2981111  
E-mail : tika01@rad.net.id



# ARTOCARPUS

Media Pharmaceutica Indonesiana

Volume 4 Nomor 2 September 2004

<b>EDITORIAL</b>	ii
<b>STUDI HUBUNGAN STRUKTUR-AKTIVITAS KAPASITAS PEREDAMAN RADIKAL BEBAS SENYAWA FLAVONOID TERHADAP 1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)</b>	47 - 52
<i>Tri Windono, Ryanto Budiono, Ivone, Sherly Valentina, Yovita Saputro</i>	
<b>PERBANDINGAN EFEK GAMAVUTON-0 DAN KURKUMIN SECARA IN VITRO TERHADAP AKTIVITAS GST KELAS MU HATI TIKUS</b>	53 - 58
<i>Sudibyo Martono, Samantha Aprilia P, Nunung Yuniarti</i>	
<b>SINTESIS SENYAWA BENZOILTIOUREA DAN UJI POTENSIASI TERHADAP TIOPENTAL PADA MENCIT (<i>MUS MUSCULUS</i>)</b>	59 - 65
<i>Dini Kesuma, Siswandono, Marcellino Rudyanto</i>	
<b>KARAKTERISASI PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE HASIL PEMURNIAN SEBAGIAN DARI <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> [pUKC470]</b>	66 - 73
<i>Mariana Wahyudi, Muliawati Sindumarta, Dessy Natalia</i>	
<b>FORMULASI SERBUK EFFERVESCENT EKSTRAK DAUN TALOK (<i>Muntingia calabura</i> L.) DENGAN BERBAGAI KONSENTRASI PEMANIS NATRIUM SIKLAMAT</b>	74 - 81
<i>Rhoina Nurisya, Nining Sugihartini, Mufrod</i>	
<b>PENGUKURAN SIFAT FISIKOKIMIA PIROKSIKAM: KELARUTAN DALAM DAPAR FOSFAT DAN LOG P OKTANOL-DAPAR FOSFAT</b>	82 - 88
<i>Ni Luh Dewi Aryani, Harry Santosa</i>	
<b>ANALISIS ZAT WARNA MERAH DALAM KRUPUK YANG DIJUAL DI WARUNG-WARUNG DI SURABAYA TIMUR</b>	89 - 95
<i>Kusuma Hendrajaya</i>	

## KARAKTERISASI PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE HASIL PEMURNIAN SEBAGIAN DARI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* [pUKC470]

Mariana Wahyudi<sup>1</sup>, Muliawati Sindumarta<sup>2</sup>, Dessy Natalia<sup>2</sup>

1 Fakultas Farmasi Universitas Surabaya

2 Departemen Biokimia MIPA Kimia Institut Teknologi Bandung

### Abstrak

Protein disulfida isomerase (PDI) merupakan multi enzim yang berfungsi mengkatalisis reaksi redoks dan reaksi isomerisasi ikatan disulfida dalam berbagai protein sekresi. PDI telah diisolasi dari *Sacharomyces cerevisiae* dengan aktivitas spesifik kecil. Sehubungan dengan over-ekspresi gen *PDI*, telah dikonstruksi plasmid pUKC470 yang mengandung gen *PDI* *S. cerevisiae*, tetapi sifat-sifat katalitik PDI *S. cerevisiae* hasil over ekspresi tersebut belum diketahui. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi enzim PDI hasil pemurnian parsial dari *S. cerevisiae* [pUKC470] untuk memperoleh informasi kinetika enzim tersebut, khususnya terhadap substrat insulin. Enzim PDI dimurnikan dari *cell free extract* transforman menggunakan metode fraksinasi amonium sulfat 60-80% diikuti dengan kromatografi kolom penukar anion DEAE-Sephacel. Kondisi optimum enzim protein disulfida isomerase PDI hasil pemurnian sebagian dari *S. cerevisiae* [pUKC470] tersebut berturut-turut adalah waktu 13 menit, pH 7,5 dan suhu 37°C. Data kinetik menunjukkan bahwa PDI termasuk enzim alosterik dengan nilai  $V_{maks}$  enzim sekitar 98 unit/ml dan  $K_M$  *apparent* terhadap substrat insulin  $8,0 \times 10^{-2}$  mM. Bacitracin merupakan modulator negatif PDI.

**Kata kunci:** protein disulfida isomerase, *Sacharomyces cerevisiae* [pUKC470], overekspresi, karakterisasi, insulin.

### Abstract

Protein disulphide isomerase (PDI) is a multi-enzyme involved in catalyzing redox and isomerization reactions of disulphide bonds in secretory proteins. PDI have been isolated from *Saccharomyces cerevisiae* in the small amount. To over-expressed the PDI, pUKC470 plasmid has been constructed which contains *S. cerevisiae* *PDI* gene but the characteristics of PDI from *S. cerevisiae* [pUKC470] transformant have not been checked yet. This investigation is focused on the characterization of partially purification of PDI from *S. cerevisiae* [pUKC470] to elucidate mechanism of action of PDI by characterizing kinetics of the enzyme towards insulin. PDI were purified from transformant cells free extract using ammonium sulphate fractionation followed by ion exchange chromatography on DEAE-Sephacel. The partially purified enzyme has optimum time of 13 minutes, optimum pH of 7.5 and optimum temperature of 37°C. Kinetics data indicated that PDI is an allosteric enzyme. PDI has  $V_{max}$  of 98 unit per mL and apparent  $K_M$  of  $8.0 \times 10^{-2}$  mM towards insulin. Bacitracin is a negative modulator for the enzyme

**Key words:** protein disulphide isomerase, *Sacharomyces cerevisiae* [pUKC470], over-expressed, characterization, insulin.

### Pendahuluan

Protein disulfida isomerase (PDI, E.C. 5.3.4.1) merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi redoks dan isomerisasi gugus S-S/-SH dalam protein-protein sekresi dan ekstraseluler yang terdapat di dalam lumen retikulum endoplasmik sel eukariot. Sebagian besar protein sekresi dan ekstraseluler mempunyai ikatan disulfida, baik intra dan/ atau intermolekuler, yang penting untuk pelipatan (*foldng*) protein yang benar agar dapat berfungsi. PDI bersama-sama dengan

peptidil prolil cis-trans isomerase (PPI) dan molekul *chaperone*, membantu proses pelipatan protein baik dalam proses kotranslasi maupun proses pascatranslasi, dengan demikian fungsi PDI di dalam sel sangat penting (1,2).

PDI dapat mengkatalisis reaksi redoks dan reaksi isomerisasi gugus S-S/-SH *in vitro*, tergantung pada potensial redoks reaksi. Ada tiga jenis reaksi yang dikatalisis oleh PDI (1): pertama, pembentukan ikatan disulfida protein. Substrat protein (misalnya RNase tereduksi) dalam keadaan tereduksi/

tereduksi sebagian, dengan keberadaan oksidasi lemah, misalnya oksigen terlarut atau sistem glutation (GSSG/GSH). Kedua, reduksi ikatan disulfida protein. Substrat protein (misalnya insulin) dalam keadaan teroksidasi sedangkan kondisi lingkungan berpotensi reduksi sangat kuat (GSH  $10^{-2}$ M). Enzim dalam kondisi ini berfungsi sebagai suatu tiol:protein disulfida oksidoreduktase (Glutation:Insulin Oksidoreduktase). Ketiga, isomerisasi ikatan disulfida protein. Substrat protein dalam keadaan teroksidasi, mengandung ikatan disulfida non-natif dan kondisi lingkungan berpotensi reduksi cukup kuat, misalnya dengan adanya DTT  $10^{-5}$  M atau GSH  $10^{-3}$  M. Enzim mengkatalisis reaksi redoks dan isomerisasi ikatan disulfida menghasilkan produk protein berikatan disulfida natif dengan konformasi yang paling stabil. *Scramble* RNase (sRNase) merupakan substrat yang paling banyak dipakai sebagai model untuk mekanisme ini, sekaligus untuk uji aktivitas PDI.

sRNase merupakan RNase natif yang direduksi total, sehingga mengandung 8 gugus -SH, dengan 105 isomer berikatan disulfida. Bentuk *scramble* dari RNase dapat kembali ke bentuk natifnya bila diberi sedikit pereaksi yang mengandung gugus sulfhidril misalnya merkaptoetanol, DTT dan sebagainya. Proses renaturasi berlangsung lambat (sampai beberapa jam) tetapi dengan PDI proses renaturasi hanya memerlukan waktu kurang dari 2 menit (3).

Insulin mengandung tiga ikatan disulfida, yaitu dua ikatan disulfida inter yang menghubungkan rantai A dan B dan satu ikatan disulfida intra yang terletak di dalam rantai A. Awal reduksi insulin oleh PDI terjadi pada ikatan disulfida inter menghasilkan rantai A dan rantai B, diduga reaksi reduksi diteruskan sampai ikatan disulfida intra (4,5).

Penelitian PDI dari *S. cerevisiae* merupakan hal yang menarik karena sebagai golongan eukariot sederhana non-patogen, *S. cerevisiae* mempunyai banyak kelebihan sehingga banyak dipakai sebagai model untuk penelitian golongan eukariot lebih tinggi.

PDI *S. cerevisiae* merupakan homodimer dengan bobot molekul masing-masing monomernya 70 kDa dan mengalami glikosilasi (diduga berjumlah 4-6 oligosakarida per sub unit PDI) (6,7). PDI *S. cerevisiae* mempunyai sifat-sifat yaitu pH optimum dan  $pI$  berturut-turut 8,5 dan 4,02. Perlakuan panas ( $55^{\circ}\text{C}$ ) selama 15 menit dapat menginaktivasi enzim.  $V_{maks}$  terhadap sRNase dan

$K_M$  PDI berturut-turut adalah 6 unit/mg protein dan  $10 \mu\text{M}$ . Aktivitas enzim dihambat oleh basitrasin (7). Basitrasin juga sering digunakan sebagai modulator enzim PDI. Mekanisme inhibisi basitrasin terhadap aktivitas PDI hingga saat ini belum diketahui dengan jelas (8).

Hasil pemurnian PDI *S. cerevisiae* yang dilakukan oleh peneliti sebelumnya menunjukkan aktivitas spesifik yang sangat rendah, yaitu 6,3 unit/mg dengan rendemen hanya 4% (7), maka dikonstruksi *S. Cerevisiae* W303 transforman. Sifat-sifat katalitik PDI hasil over ekspresi dari *S. cerevisiae* [pUKC470] belum diketahui sehingga pada penelitian ini akan diteliti karakteristik katalitik PDI dari transforman, khususnya terhadap substrat insulin. Diharapkan dari penelitian ini dapat diperoleh informasi penting tentang karakteristik katalitik PDI *S. Cerevisiae* transforman, khususnya dengan substrat insulin.

## Metode penelitian

### Bahan

#### Media pembiakan

Media pembiakan yang digunakan meliputi: MM-Leu [*Yeast Nitrogen Base* tanpa asam amino (Sigma), glukosa (E. Merck) Ade (E. Merck), Ura (E. Merck), His (E. Merck), dan Trp (E. Merck), bacto agar (E. Merck).

#### *Saccharomyces cerevisiae* [pUKC470]

*S. cerevisiae* [pUKC470] yang digunakan pada penelitian ini adalah galur W303 dengan genotip *ura 3-1, leu 2-3-112, his 3-11-15, ade 2-1, trp 1-1*; yang telah ditransformasi dengan plasmid pUKC470 (*University of Kent at Canterbury*, Inggris). Plasmid ini berukuran 23.000 pasangan basa (pb), berasal dari cDNA *S. cerevisiae* fragmen 14.500 pb BamHI yang mengandung PDI1, diklon dalam pMA3a ( $\text{Amp}^r$ ,  $\text{Tet}^r$ ; *LEU2*) (6,9).

## Metode kerja

### Pemeliharaan Biakan Murni

Untuk pemeliharaan *S. cerevisiae* [pUKC470] digunakan medium selektif, yaitu MM-Leu [*Yeast Nitrogen Base* tanpa asam amino 0,67%; glukosa 2%; pH 5,5; dengan tambahan Ade, Ura, His, dan Trp masing-masing 1ml larutan 2 % (b/v) untuk setiap 100 ml media]. Untuk membuat medium MM-Leu padat ditambahkan bacto agar 2,5 % (b/v). Inkubasi biakan dilakukan dalam inkubator bersuhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 2 - 4 hari.

### Penentuan kadar protein

Kadar protein ditentukan dengan metode Lowry *dkk.* Pembacaan absorbansi campuran reaksi pada panjang gelombang 725 nm. Konsentrasi protein larutan sampel diperoleh dengan menggunakan kurva baku protein BSA (10).

### Isolasi enzim PDI

Sel transforman, yaitu *S. cerevisiae* [pUKC470] diproduksi dalam MM-Leu cair dan diinkubasi pada suhu 30°C, kecepatan 150 rpm selama 20 jam. Untuk pembuatan inokulum dan produksi sel dilakukan pada kondisi yang sama.

Sel *S. cerevisiae* diproduksi dan dipanen dengan sentrifugasi dingin (4°C) pada 12.000 rpm (rotor JA-20) selama 15 menit. Pasta sel yang diperoleh dicuci dua kali, pertama dengan bufer A (EDTA 10mM, NaCl 50mM, bufer natrium fosfat 50mM) pH 7,5 kemudian dengan bufer A yang mengandung 2mM larutan PMSF. Selanjutnya pelet sel diresuspensikan dalam bufer A yang mengandung 2mM PMSF dengan perbandingan 1:1 (b/v).

Pemecahan sel dilakukan dengan cara mekanis yaitu pengocokan dengan manik-manik gelas (*glass bead* diameter  $\pm$  0,5mm, BDH) (9). Kemudian *cell free extract* dipisahkan dari manik-manik gelas dan debris sel dengan cara sentrifugasi dingin (4°C) pada 12.500 rpm (rotor JA-20), selama 20 menit.

### Pemurnian enzim PDI dari sel *S. Cerevisiae* [pUKC470]

PDI dari *cell free extract* dimurnikan dengan fraksinasi ammonium sulfat 60-80%, endapan protein dari fraksi tersebut dilarutkan di dalam bufer B (EDTA 20 mM, NaCl 50 mM, bufer natrium fosfat 50mM) pH 6,7 dan didialisis terhadap bufer dialisis (bufer yang sama dengan kadar 5 kali lebih encer). Protein dimurnikan lebih lanjut menggunakan kromatografi kolom penukar anion DEAE-Sephacel. Kolom berukuran 2,6x20cm. Suspensi DEAE-Sephacel disetimbangkan dengan bufer A pH 7,5. Pengisian kolom dengan bubuk DEAE-Sephacel dan pekerjaan selanjutnya dilakukan di ruang dingin (4°C). *Working pressure* dari sistem kolom diatur 28 sampai 30 cm dengan laju aliran buffer dari *reservoir* 12 mL per jam. Elusi protein sampel dilakukan pertama dengan 500mL bufer fosfat 0,05M pH 7,5 mengandung NaCl 0,05M dan EDTA 0,01M; diikuti elusi gradien linier dengan 450mL bufer yang sama, pH 6,7 mengandung NaCl 0,05-0,26M kemudian diakhiri elusi bertingkat dengan 250 mL bufer

yang sama mengandung NaCl 0,8M. Tabung-tabung effluen nomor 213-216 dijadikan satu untuk selanjutnya dikarakterisasi (7).

### Uji aktivitas enzim PDI

Aktivitas PDI diuji dengan metode yang digunakan oleh Sutter *et al.* (11). Uji aktivitas ini didasarkan pada kemampuan enzim untuk mereduksi ikatan disulfida insulin dalam  $10^{-2}$  M DTT (12).

Ke dalam kuvet mikro (tabung uji) yang telah berisi 650  $\mu$ L bufer kalium fosfat 0,1 M pH 7,0 ditambahkan 100  $\mu$ L EDTA 20 mM dan 100  $\mu$ L larutan baku insulin (Sigma) 1,67 mM (dalam bufer kalium fosfat 0,1 M pH 7,0). Campuran reaksi dipreinkubasi dalam spektrofotometer yang bersuhu 30°C selama 20 menit, kemudian ke dalam campuran reaksi ditambahkan 150 $\mu$ L larutan enzim-DTT [50  $\mu$ L larutan enzim dicampur dengan 100 $\mu$ L larutan ditiotreititol (DTT, Sigma) 10 mM]. Campuran reaksi dihomogenkan, kemudian absorbansi campuran segera dibaca pada  $A_{650}$  setiap interval waktu 1 menit sampai tidak terjadi perubahan absorbansi. Aktivitas enzim PDI dihitung dari nilai absorbansi pada *slope* terbesar. Tabung kontrol diperlakukan sama dengan tabung uji, kecuali larutan enzim ditambahkan dalam keadaan non aktif (yaitu tanpa DTT). Larutan DTT ditambahkan terpisah yaitu setelah penambahan enzim).

Satu unit aktivitas PDI didefinisikan sebagai aktivitas PDI yang dapat mereduksi ikatan disulfida antar rantai insulin menghasilkan perubahan  $A_{650}$  sebesar 0,001 per menit pada kondisi percobaan

### Karakterisasi enzim PDI

Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh informasi mengenai sifat-sifat enzim PDI hasil pemurnian yang meliputi waktu, pH dan suhu optimum enzim PDI serta data kinetik enzim PDI dan pengaruh bacitracin sebagai modulator.

### Penentuan waktu optimum kerja enzim

Penentuan waktu optimum kerja enzim dilakukan untuk mengetahui waktu optimum yang diperlukan enzim untuk berinteraksi dengan substrat menghasilkan produk. Tahap pengerjaan sama seperti pada penentuan aktivitas PDI. Absorbansi dibaca pada tiap interval waktu 1 menit. Waktu optimum kerja enzim merupakan waktu dimana enzim menunjukkan aktivitas tertinggi.

### Penentuan pH optimum kerja enzim.

Pada penentuan pH optimum, digunakan bufer kalium fosfat 0,1 M berbagai pH sesuai pH pengujian, yaitu 7,0; 7,3; 7,5; 7,7 dan 8,0.

Substrat insulin dilarutkan dalam bufer kalium fosfat 0,1M pada pH yang sesuai. Tahap pengerjaan sama seperti pada penentuan aktivitas enzim PDI. Absorbansi dibaca pada menit ke 10.

#### Penentuan suhu optimum kerja enzim.

Pada penentuan suhu optimum, campuran yang terdiri dari bufer kalium fosfat 0,1 M pH optimum, larutan EDTA, larutan substrat insulin dan larutan enzim-DTT ditempatkan dalam tabung *ependorf*, lalu diinkubasi dalam penangas air pada berbagai suhu berturut-turut 26,5; 30; 35; 37; 40; 45 dan 55°C. Waktu inkubasi tetap (10 menit). Tahap pengerjaan berikutnya sama seperti pada penentuan aktivitas enzim PDI. Setengah menit sebelum waktu inkubasi berakhir, campuran reaksi dipindahkan ke kuvet dan diukur absorbansinya pada  $A_{650}$ .

#### Pengaruh konsentrasi modulator bacitracin terhadap aktivitas enzim PDI.

Penelitian ini dilakukan dengan membuat campuran 550 $\mu$ l bufer kalium fosfat 0,1M pH optimum, 100 $\mu$ l EDTA 20mM, 100 $\mu$ l larutan baku insulin 1,67mM, 100 $\mu$ l bacitracin berbagai konsentrasi ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ M) dan 150 $\mu$ l larutan enzim-DTT dalam tabung *ependorf*, lalu diinkubasi dalam penangas air suhu optimum (10 menit). Tahap pengerjaan berikutnya sama seperti pada penentuan aktivitas enzim PDI.

### Hasil dan pembahasan

Kultivasi sel *S. cerevisiae* [pUKC470] dalam 15 liter medium produksi, menghasilkan pasta sel sebanyak kurang lebih 37,77 gram. Setelah dipecah diperoleh *cell free extract* dengan aktivitas spesifik enzim sebesar

1,87unit/mg. Kemudian dilakukan pemurnian dengan fraksinasi ammonium sulfat dilanjutkan dengan kromatografi kolom penukar anion menggunakan DEAE-Se-phacel. Pada pemurnian dengan DEAE-Se-phacel aktivitas enzim tertinggi terdapat pada tabung-tabung efluen nomor 213-216 yang kemudian disatukan untuk dikarakterisasi. Aktivitas spesifik larutan enzim tersebut sebesar 255,28 unit/mg.

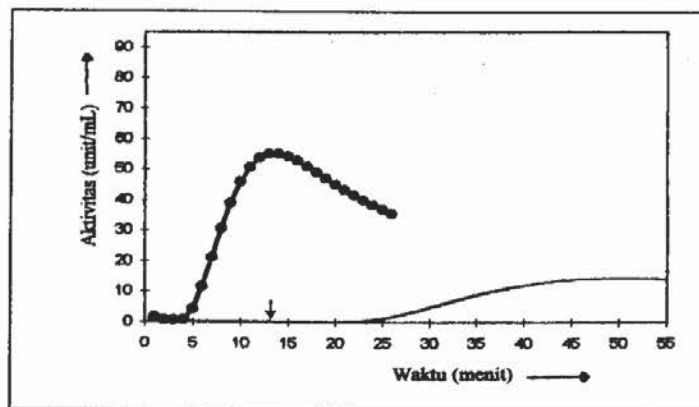
SDS-PAGE larutan protein hasil pemurnian sampai kolom DEAE-Sephacel menunjukkan adanya 5 pita; dengan 2 pita berimpit pada daerah 70 kDA (data tidak tercantum). Belum dapat dipastikan pita yang mana di antara keduanya yang merupakan pita PDI. Hasil uji homogenitas dengan SDS-PAGE ini menunjukkan bahwa hasil pemurnian sampai kolom DEAE-Sephacel belum sempurna karena masih belum diperoleh pita tunggal.

#### Karakterisasi Enzim PDI dari *S. cerevisiae* [pUKC470]

##### Waktu Optimum Enzim

Hasil uji aktivitas PDI pada berbagai waktu dapat dilihat pada Gambar 1. Waktu inkubasi optimum enzim PDI berinteraksi dengan substrat dan menghasilkan produk terdapat pada menit ke 13.

Penentuan kondisi optimum dan data lain selanjutnya, dilakukan di sekitar waktu optimumnya yaitu 10 menit. Waktu optimum enzim PDI berinteraksi dengan substrat menghasilkan produk berada pada menit ke 13, sebelum menit ke-20, saat pengaruh DTT mulai terjadi, sehingga pengaruh DTT terhadap aktivitas enzim PDI dapat diabaikan (gambar 1).



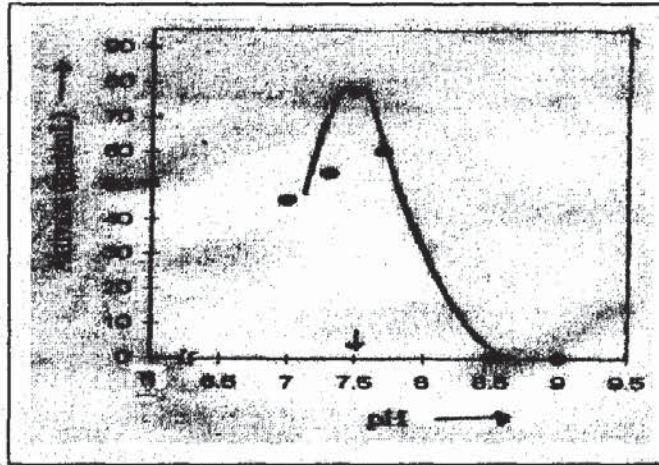
Gambar 1. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas PDI dan laju reaksi redoks DTT terhadap substrat insulin.

(—●—): PDI *S. cerevisiae* [pUKC470]; (—): DTT.

**pH Optimum Enzim**

Hasil pengujian pengaruh pH terhadap aktivitas enzim PDI dapat dilihat pada Gambar 2. Grafik aktivitas enzim pada berbagai pH membentuk pola menyerupai lonceng (*bell-shaped*) asimetris, disebabkan karena enzim belum murni. pH terendah dimulai dengan 7,0 karena pada pH yang lebih ren-

dah insulin sebagai substrat tidak larut. Dengan demikian dapat disimpulkan pH optimum enzim PDI berinteraksi dengan substrat insulin untuk menghasilkan produk adalah 7,5. pH optimum untuk substrat insulin ini berbeda dengan pH optimum PDI dengan substrat sRNase yaitu 8,5 (7).

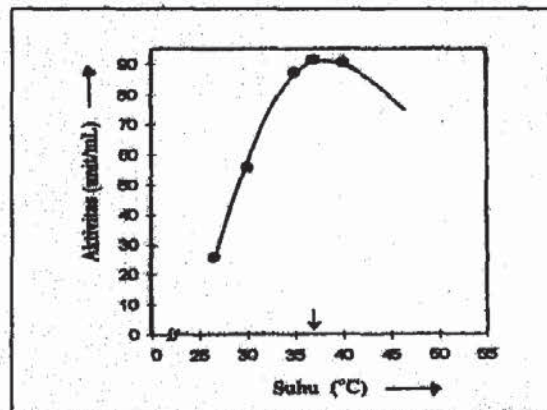


Gambar 2. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim PDI *S. cerevisiae* [pUKC470] terhadap substrat Insulin

**Suhu Optimum Enzim**

Hasil penentuan suhu optimum enzim dapat dilihat pada Gambar 3. Suhu optimum

PDI berinteraksi dengan substrat insulin dan menghasilkan produk adalah suhu 37°C.



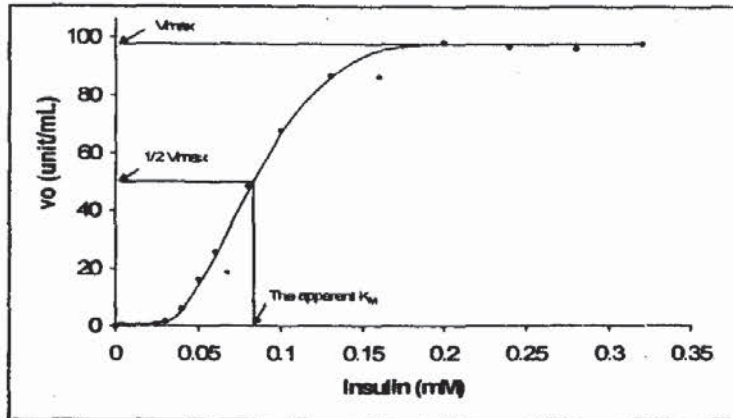
Gambar 3. Pengaruh suhu terhadap aktivitas enzim PDI *S. cerevisiae* [pUKC470] terhadap substrat insulin.



**$V_{maks}$  dan  $K_M$  apparent.**

Aktivitas enzim pada berbagai konsentrasi substrat insulin dapat dilihat pada Gambar 4. Pada grafik tersebut terlihat bahwa kurva aktivitas enzim ( $v_o$ ) terhadap kon-

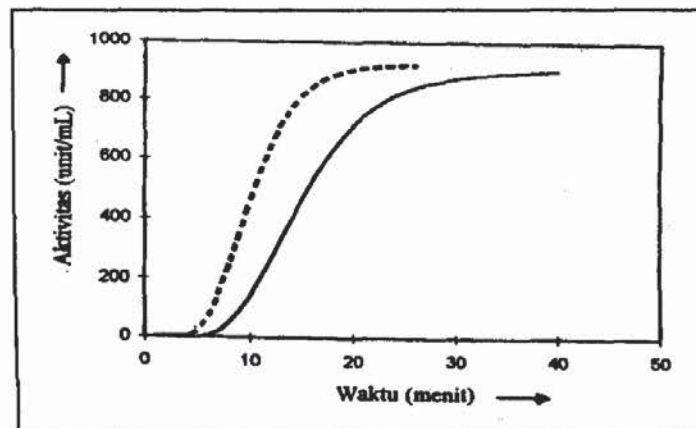
sentration substrat [S] merupakan kurva sigmoid, yang menunjukkan bahwa enzim PDI adalah enzim alosterik (13).  $V_{maks}$  enzim sekitar 98,00 unit/mL, sedangkan  $K_M$  apparent enzim sekitar  $8,0 \times 10^{-2}$  mM.



**Gambar 4. Pengaruh konsentrasi substrat insulin terhadap aktivitas enzim PDI *S. cerevisiae* [pUKC470].**

Pada berbagai literatur diketahui bahwa sifat katalitik dengan substrat RNase menunjukkan bahwa kurva aktivitas enzim ( $v_o$ ) terhadap konsentrasi substrat [S] merupakan kurva hiperbolik (Michaelis-Menten) (7,12,14). Hasil ini berbeda bila dibandingkan dengan sifat katalitik PDI untuk substrat insulin. Sifat sigmoid kurva enzim PDI *S. cerevisiae* [pUK-

C470] hasil pemurnian dibuktikan dengan enzim PDI sapi standar, yang menunjukkan bahwa enzim PDI benar-benar merupakan enzim alosterik. Pada Gambar 5 terlihat bahwa pola kurva sigmoid PDI *S. cerevisiae* [pUKC470] hasil pemurnian menyerupai pola kurva PDI sapi yang digunakan sebagai ba-

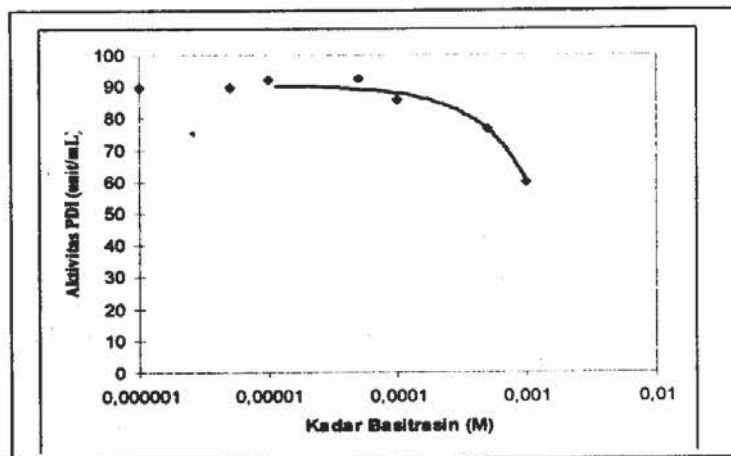


**Gambar 5. Aktivitas enzim PDI *S. cerevisiae* [pUKC470] hasil pemurnian dan PDI sapi standar terhadap waktu.**  
Keterangan: (.....): PDI *S. cerevisiae* [pUKC470]; (—): PDI sapi standar

**Pengaruh modulator bacitracin terhadap aktivitas enzim PDI.**

Pengaruh modulator bacitracin terhadap aktivitas enzim dapat dilihat pada Gambar 6. Pengaruh bacitracin terhadap aktivitas enzim mulai terlihat pada konsentrasi modulator di atas  $5 \times 10^{-5}$  M. Pada konsentrasi bacitracin  $1 \times 10^{-3}$  M, aktivitas enzim PDI tinggal 60,10 unit/mL atau sekitar 67% dibandingkan aktivitas awal tanpa bacitracin (89,10 unit/mL). Uji aktivitas enzim dengan penam-

bahan bacitracin di atas konsentrasi tersebut tidak dapat dilakukan karena bacitracin tidak larut. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bacitracin merupakan modulator negatif, tetapi belum dapat ditentukan apakah bacitracin merupakan modulator negatif monovalen atau polivalen karena sampai saat penelitian ini belum ada pustaka yang mengatakan adanya modulator lain terhadap enzim PDI *S. cerevisiae*.



**Gambar 6. Pengaruh modulator bacitracin terhadap aktivitas PDI *S. cerevisiae* [pUKC470] terhadap substrat insulin.**

**Simpulan dan Saran**

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum enzim protein disulfida isomerase (PDI) hasil pemurnian sebagian dari *S. cerevisiae* [pUKC470] berturut-turut adalah waktu 13 menit, pH 7,5 dan suhu 37°C. Data kinetik menunjukkan bahwa PDI termasuk enzim alosterik dengan nilai  $V_{maks}$  enzim sekitar 98 unit/ml dan  $K_M$  *apparent* terhadap substrat insulin  $8,0 \times 10^{-2}$  mM. Bacitracin merupakan modulator negatif PDI.

Disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai data-data kinetik enzim hasil pemurnian sebagian tersebut, juga dilakukan pemurnian lebih lanjut, misalnya menggunakan kolom kromatografi hidrofobik atau yang lainnya; dan karakterisasi sifat-sifat PDI *Saccharomyces cerevisiae* [pUKC470] murni dengan substrat insulin.

**Daftar Pustaka**

1. Freedman RB, Hirst TR and Tuite MF. Protein Disulfide Isomerase Building

Bridges in Protein Folding. Trends in Biochem Sci 1994;19: 331-6.

2. Gething MJ and Sambrook J. Protein Folding in the Cell. Nature 1992; 355: 33-44.
3. Anfinsen CB. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. Science 1973, 181: 223-30.
4. Chandler ML and Varandani PT. Kinetic Analysis of the Mechanism of Insulin Degradation by Glutathione - Insulin Trans - Hydrogenase (Thiol:Protein-Di-sulfide Oxidoreductase). Biochemistry 1975, 14: 2107-15.
5. Varandani PT. Insulin Degradation IV. Sequential Degradation of Insulin by Rat Kidney, Heart and Skeletal Muscle Homogenates. Biochim Biophys Acta 1973; 295: 630-6.
6. Farquhar R, Honey N, Murant SJ, Bossier P, Schultz L, Montgomery D, Ellis RW, Freedman RB and Tuite MF. Protein Disulfide Isomerase Is Essential for Viability in *Saccharomyces cerevisiae*, Gene 1991; 108: 81-9.

7. Mizunaga T, Katakura Y, Miura T and Maruyama Y. Purification and Characterization of Yeast Protein Disulfide Isomerase. *J Biochem* 1990;108: 846 – 51.
8. Mandell R, Ryser HJP, Ghain F, Wu M and Peak D. Inhibition of a Reductive Function of the Plasma Membrane by Bacitracin and Antibiotics Against Protein Disulfide Isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4112–6.
9. Natalia D. Studies on Yeast Protein Disulphide Isomerase. Disertasi 1994, Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury.
10. Bollag DM. *Protein Methods*. 2nd Ed. New York: Wiley-Liss Inc. 1996:1-268.
11. Sutter DK, Hostens K, Vandekerckhove J and Fiers W. Production of Enzymatically Active Rat Protein Disulfide Isomerase in *Escherichia coli*. *Gene* 1994; 141, 163-70.
12. Freedman RB, Brockway BE and Lambert N. Protein Disulphide-Isomerase and the Formation of Native Disulphide Bonds. *Biochem Soc Trans*, 1984; 12: 929-32.
13. Palmer T. *Understanding Enzymes*, 4th Ed. London: Prentice Hall. 1995: 223-250.
14. Kaska DD, Kivirikko KI and Myllylä R. Purification and Characterization of Protein Disulphide-Isomerase from the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J* 1990; 268: 63-8.