

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 Kusumandioko 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 :

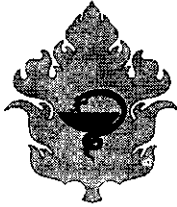
Asih Darni
Sri Andriyani

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

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

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

Mariana Wahyudi¹, Muliawati Sindumarta², Dessy Natalia²

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 8.0×10^{-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

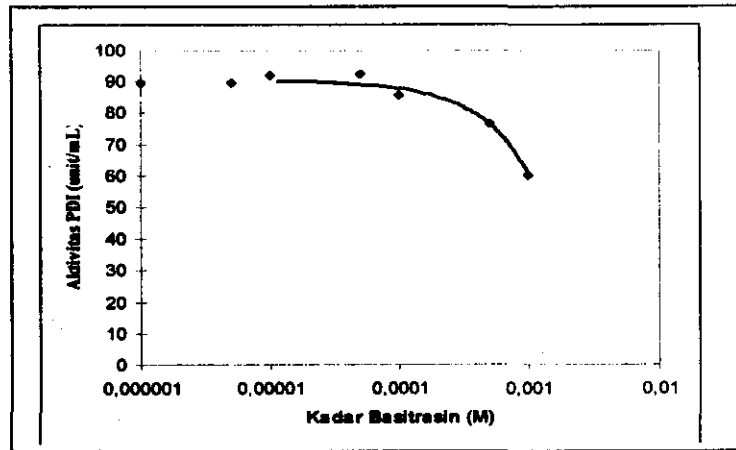
peptidil prolin cis-trans isomerase (PPI) dan molekul *chaperone*, membantu proses pelipatan protein baik dalam proses kotranslasi maupun proses pascatranslasi, dengan demikian fungsi PDI di dalam sel sangat penting (1,2).

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/

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 5×10^{-5} M. Pada konsentrasi bacitracin 1×10^{-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 Disulphide 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–Disulfide 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, Bosier 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 Myllyla R. Purification and Characterization of Protein Disulphide-Isomerase from the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J* 1990; 268: 63-8.