

ANALISIS PROTEIN JARINGAN OTAK SAPI DENGAN METODE ISOLASI, PURIFIKASI DAN VISUALISASI

I PUTU DEDY ARJITA
Universitas Nahdlatul Wathan Mataram

ABSTRAK

Enzim *Glutamat Dekarboksilase* (GAD) merupakan suatu enzim yang termasuk dalam kelompok *liase* dan bekerja aktif dalam pemecahan ikatan C-C, C-O, C-N dan penghilangan gugus karboksil. Terdapatnya antibodi terhadap enzim GAD pada serum penderita *diabetes mellitus type I* merupakan salah satu marker untuk mendeteksi adanya kerusakan sel-sel beta-pankreas secara *autoimmune*. Keberadaan enzim GAD pada tanaman, mikroorganisme maupun mamalia, khususnya pada jaringan otak sapi dapat diketahui dengan cara isolasi dan purifikasi. Selama ini pemeriksaan pre-diabetes biasanya membutuhkan harga *reagent diagnostik* yang cukup mahal, sehingga dilakukan usaha mencari metode sumber enzim GAD yang lebih murah dan memungkinkan untuk diterapkan pada manusia. Metode yang dapat digunakan untuk mengisolasi dan memurnikan (purifikasi) enzim GAD sebagai protein yang ada pada jaringan otak sapi adalah dialisis, kromatografi filtrasi gel dan elektroforesis, yang dapat dilanjutkan dengan metode *immunoblotting* untuk mengetahui sifat protein yang lebih spesifik.

Kata kunci : Isolasi, purifikasi, jaringan otak sapi

PENDAHULUAN

Enzim glutamat dekarboksilase (GAD) merupakan suatu enzim yang termasuk dalam kelompok liase dan bekerja aktif dalam pemecahan ikatan C-C, C-O, C-N dan penghilangan gugus karboksil (Lehninger, 1988).

Enzim GAD dapat diisolasi dari jaringan otak sapi dan mamalia yang lain, tanaman dan mikroorganisme. *Crude* GAD yang diisolasi dari jaringan otak sapi mampu melaksanakan aktivitasnya untuk menghasilkan GABA dari asam glutamat pada kondisi pH 6,9 dan suhu 25° C (Aulani'am, 1995).

Adanya antibodi terhadap enzim GAD (anti-GAD) yang terdapat pada serum penderita diabetes mellitus tipe 1 (insulin dependent) merupakan salah satu marker yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya kerusakan sel beta-pankreas secara *autoimmune*.

Untuk pemeriksaan penderita pre-diabetes biasanya membutuhkan harga reagent diagnostik yang cukup mahal. Oleh karena itu perlu dilakukan usaha untuk mencari sumber enzim GAD yang relatif lebih murah dan memungkinkan untuk diterapkan pada manusia. Dengan demikian perlu diketahui bagaimana prosedur untuk memperoleh isolat dan pemurnian enzim GAD dari bahan yang relatif murah, seperti dari jaringan otak sapi.

ENZIM GAD DAN PEMURNIANNYA

Enzim merupakan biokatalisator yang mempunyai aktivitas katalitik yang jauh lebih besar daripada katalisator sintetik (Lehninger, 1988).

Pemurnian enzim berdasarkan sifat-sifat kelarutannya bergantung pada konsentrasi garam yang terlarut, polaritas pelarut, pH dan suhu (Voet and Voet, 1990). Enzim GAD dapat diisolasi dari jaringan otak mamalia, tanaman dan bakteri. Isolasi GAD dapat dilakukan dengan cara seperti mengisolasi enzim-enzim intraseluler dengan memperhatikan sifat-sifat fisik dan kimianya (Schomburg, 1990 dalam Arie, 1998).

Isolasi dan pemurnian enzim dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya yang cukup penting, adalah :

1. Dialisis

Dialisis merupakan proses pemisahan molekul yang lebih besar pada suatu larutan dengan menggunakan membran semipermeabel yang hanya dapat dilalui oleh molekul-molekul yang berukuran kecil. Pada proses dialisis terjadi perpindahan garam atau bahan yang mempunyai berat molekul lebih rendah daripada sampel berganti dengan larutan buffer (Aulani'am, 1995).

2. Kromatografi Filtrasi Gel

Kromatografi filtrasi gel merupakan metode untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran molekulnya. Fase diam yang digunakan adalah partikel-partikel inert yang mempunyai pori-pori kecil dan ukuran terkontrol. Materi support yang digunakan adalah *cellulosa* dan *polystyrene*. Selain itu digunakan *sephadex* (Renee et al, 1985).

3. Elektroforesis

Elektroforesis merupakan studi tentang pergerakan molekul pada medan listrik. Pergerakan molekul pada suatu medan listrik dipengaruhi oleh ukuran, bentuk, muatan dan sifat biologi serta kimia molekul tersebut. Pergerakan partikel bermuatan tidak hanya karena muatan saja, tetapi juga pengaruh voltase di antara elektrode. Pergerakan suatu partikel bermuatan pada suatu medan listrik didefinisikan sebagai mobilitas, yaitu kecepatan per unit medan listrik (Renee et al, 1985). Hubungan antara mobilitas partikel dengan medan listrik adalah sebagai berikut :

$$M.f = E.q$$

dimana :M= kecepatan pergerakan molekul, E = voltase (volt/cm), f = koefisien gesekan partikel, q = muatan listrik

Adapun alat dan bahan yang dibutuhkan, adalah :

1. Alat :

Alat yang dipergunakan adalah : Elektroforesis Apparatus Merk Bio-Rad, Sentrifuge Dingin, Kromatografi Kolom, Stirrer dan Beacker Glass.

2. Bahan :

Bahan-bahan yang dibuthkan, antara lain : Jaringan Otak Sapi, Buffer Ekstrak GAD (dengan kandungan : 100 mM pindaksol 5-phosphat (PLP), 1 mM 2-aminoetilisotiuronium bromida (AET), 4 mM fenilmetilsulfonilfluorida (PMSF), 0,0025 M etilendiamin tetraasetat (EDTA), 1 M sukrose), Sephadex G-75, Amonium Sulfat, Selofan, Buffer Phosphat 0,2 M pH 7, HCL 0,01 M, Sodium dodecyl sulfat (SDS), Commasive Brilliant Blue, Acrylamide, TEMED, dan BaCl₂ 0,1 M.

Sedangkan langkah kerja yang ditempuh untuk mengisolasi dan memurnikan enzim GAD dari jaringan otak sapi, adalah :

1. Isolasi Protein/Enzim dari Jaringan Otak Sapi.

- a. Homogenasi 5 gram jaringan otak sapi dengan cara penggerusan dalam mortar dan ditambahkan larutan buffer pengekstrak GAD.
- b. Sentrifuse 3000 rpm, 4° C, selama 20 menit.
- c. Supernatant crude GAD diambil dan perlakukan untuk pemurnian.

2. Pemurnian Enzim GAD

2.1. Pemurnian dengan Amonium Sulfat :

- a. Supernatant ditambahkan dengan amonium sulfat 0,853 gr/5 ml, kemudian diaduk dan dibiarkan selama 10 menit.
- b. Sentrifuse 3000 rpm, 4° C, selama 20 menit. Fraksi endapan I dan supernatant I yang diperoleh kemudian dipisahkan.
- c. Supernatant I ditambahkan dengan amonium sulfat 0,594 gr/3 ml, kemudian diaduk dan dibiarkan selama 10 menit.
- d. Sentrifuse 3000 rpm, 4° C, selama 20 menit. Fraksi endapan II yang diperoleh kemudian dipisahkan dari supernatannya.

- e. Fraksi I dan II disuspensikan dalam buffer fosfat, kemudian dimasukkan ke dalam kantong selofan dan didialisis dengan cara merendam kantong selofan dalam buffer fosfat pada beaker glass semalaman.
- f. Dilakukan pengadukan dengan stirrer, dengan kecepatan 5 rpm dan buffer diganti setiap 6 jam.
- g. Untuk mengetahui akhir dialisis, dilakukan uji larut dengan HCl 0,01 M dan BaCl₂ 0,1 M.

2.2. Pemurnian dengan Kromatografi Filtrasi Gel :

- a. Hasil isolat crude, fraksi I dan II dilewatkan dalam kolom kromatografi sephadex G-75 dan dielusi oleh PBS 0,2 M, sehingga diperoleh beberapa fraksi flow rate 1 ml/menit.
- b. Kolom kromatografi disiapkan dengan 0,5 gram sephadex G-75, dilakukan swelling dengan merendam dalam aqua DM, kemudian dilanjutkan dengan degas selama 1 jam.
- c. Dimasukkan dalam kolom yang di bawahnya sudah diisi glasswool. Penyeimbangan kolom dilakukan dengan menggunakan PBS 0,2 M, pH 7.
- d. Sampel yang akan dimurnikan dimasukkan dalam kolom dan dielusi dengan PBS 0,2 M dan eluat ditampung sampai 10 fraksi dan setiap fraksi 1 ml.

3. Visualisasi Hasil Isolat dan Purifikasi

Enzim dideteksi Berat Molekul Protein menggunakan Metode Gel Elektroforesis (SDS- PAGE).

- a. Berat molekul crude hasil pemurnian dengan metode amonium sulfat bertingkat dan hasil fraksinasi kolom sephadex G-75 dideteksi dengan metode elektroforesis SDS-PAGE.
- b. Pewarnaan dengan menggunakan pewarna *commasive brilliant blue*.

ANALISIS PROSEDUR

Isolasi merupakan tahap pertama yang dilakukan pada purifikasi suatu protein. Penggerusan jaringan otak sapi dalam mortar merupakan metode abrasi sel yang dapat digolongkan sebagai teknik mekanik (fisik), yang bertujuan untuk memisahkan komponen dan kompartemen sel secara kasar untuk selanjutnya akan mempermudah dalam homogenasi. Penambahan buffer ekstrak selama penggerusan bertujuan untuk mempertahankan agar kondisi komponen sel tetap optimum seperti keadaan yang sebenarnya dan tidak mengalami perubahan.

Isolat crude GAD yang diperoleh sebelum disentrifuse perlu penambahan amonium sulfat untuk presipitasi garam secara *salting out*, sehingga menyebabkan interaksi hidrofobik antar molekul protein., Interaksi hidrofobik antar molekul protein akan mengakibatkan kelarutan protein menjadi rendah dan akan mengakibatkan penggumpalan, sehingga mudah dapat dipisahkan dengan sentrifuse. Penggunaan amonium sulfat lebih didasarkan pada sifat kelarutannya yang tinggi, tidak merusak struktur protein dan disamping itu, harganya relatif lebih murah.

Adanya kelebihan dalam penggunaan garam amonium sulfat dapat diatasi melalui *desalting* dengan cara dialisis dalam buffer fosfat 0,2 M, dimana garam amonium sulfat akan keluar melalui kantong selofan yang bersifat semipermeabel.

Pada proses dialisis, terjadi perpindahan garam amonium sulfat yang mempunyai berat molekul lebih rendah daripada sampel, akan berganti dengan larutan buffer. Difusi garam dari satu sisi membran ke sisi yang lain terjadi karena adanya gradien konsentrasi. Penghentian dialisis dilakukan apabila tercapai keadaan kesetimbangan, yaitu keadaan konsentrasi bahan yang dapat mengalami dialisis adalah sama, antar di luar dengan di dalam kantong selofan.

Enzim GAD dari jaringan otak sapi yang ada di dalam selofan dapat dimurnikan lebih lanjut dengan penggunaan teknik kromatografi filtrasi gel bentuk kolom, yaitu sistem pengaliran suatu fluida melalui kolom yang mengandung matriks bahan pengisi dan substansi yang ingin dipisahkan menjadi komponen dengan adanya perbedaan daya ikat terhadap bahan pengisi. Matriks pengisi kolom digunakan sephadex G-75 yang bersifat hidrofilik.

Larutan hasil isolat crude, fraksi I dan fraksi II yang mengandung bahan dengan ukuran molekul bervariasi akan bergerak di sepanjang kolom dengan pengaruh aliran pelarut secara berkesinambungan. Molekul yang mempunyai ukuran lebih besar dibandingkan pori, tidak dapat masuk ke dalam pori-pori gel, sedangkan yang mempunyai ukuran molekul lebih kecil dapat masuk ke dalam pori-pori gel, sehingga molekul yang mempunyai ukuran lebih besar akan terelusi terlebih dahulu oleh PBS 0,2 M.

Pemurnian enzim GAD dilakukan secara bertahap dengan metode pengendapan amonium sulfat (salting out) dan filtrasi gel menggunakan kromatografi kolom sephadex G-75. Tujuan pemurnian bertahap ini adalah untuk dapat menghasilkan enzim GAD yang semakin tinggi pula tingkat kemurniannya, yang ditandai dengan semakin meningkatnya aktivitas spesifik dari enzim tersebut. Apabila enzim langsung dimurnikan dengan kolom filtrasi tanpa bertahap terlebih dahulu, maka protein-protein yang berfungsi sebagai ko-enzim masih didapatkan pada fraksi-fraksi hasil filtrasi, sedangkan molekul-molekul yang berukuran kecil akan terjebak di dalam pori-pori kolom.

Pergerakan suatu partikel bermuatan pada suatu medan listrik didefinisikan sebagai mobilitas, yaitu kecepatan per unit medan listrik. Apabila suatu protein ditempatkan pada suatu gradien pH, maka protein tersebut akan bergerak dengan pengaruh medan listrik menuju suatu daerah dengan pH tertentu, yang mana protein tersebut tidak bermuatan ; pH, dimana suatu protein tersebut tidak bermuatan, disebut pH isoelektrik.

Terdapatnya pola pita yang terjadi pada hasil elektroforesis menunjukkan bahan-bahan protein yang ada pada setiap fraksi dan crude hasil filtrasi gel maupun hasil pengendapan amonium sulfat memisah berdasarkan berat molekulnya. Protein dengan berat molekul yang lebih kecil akan bergerak lebih dahulu dibandingkan dengan berat molekul yang lebih besar. Untuk menentukan jenis protein berdasarkan berat molekulnya pada setiap fraksi dan crude, maka masih diperlukan adanya protein murni yang diketahui terlebih dahulu, yang digunakan sebagai standard. Dengan demikian, maka jenis protein berdasarkan berat molekulnya dapat ditentukan. Dari suatu pengalaman yang pernah dilakukan Aulani'am et al (1999) pada jaringan otak sapi, hasil elektroforesis menunjukkan bahwa terdapat suatu protein dengan berat molekul 65 kDa pada setiap fraksi hasil filtrasi gel maupun pada crude dari hasil pengendapan dengan amonium sulfat.

PENUTUP

Enzim GAD dapat diperoleh dari jaringan otak sapi, disamping tanaman dan mikroorganismenya. Untuk dapat mengisolasi dan memurnikan enzim ini, maka dapat dilakukan secara bertahap dengan dialisis, kromatografi filtrasi gel dan selanjutnya dengan elektroforesis.

Untuk dapat menentukan jenis protein/enzim yang lebih spesifik dari jaringan otak sapi, maka hasil isolasi maupun pemurniannya perlu dilanjutkan dengan metode *imunoblotting*.

DAFTAR PUSTAKA

- Arie, S. 1998. *Karakterisasi dan Pemurnian Enzim Glutamat Dekarboksilase (GAD) dari Otak Sapi*. Tesis. PPS Unibraw. Malang.
- Aulani'am dan Fatchiyah, 1995. *Isolasi dan Karakterisasi Crude Enzim GAD dari Jaringan Otak Sapi*. Bagian Kimia FMIPA Unibraw. Malang.
- Contran RS, Kumar V, Collins T, 1999. *Robins Pathologic Basis of Disease* 6th edition, London : WB Saunders Company.
- Dorothy, E.S., 2000. *Intisari Biokimia*. Bina Rupa Aksara. Jakarta.
- Lehninger, L. 1988. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*. Erlangga. Jakarta.
- Renee, R., and Joan, M. 1985. *Basic Biochemical Methods*. Brisbane-Toronto.Singapore.
- Voet and Voet, J. 1990. *Biochemistry*. John Willey and Zsons, Inc. New York.
- William, F.G., 2004. *Fisiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.