

ISOLASI DAN KARAKTERISASI TIROSIN KINASE HASIL ISOLASI SPERMATOZOA TIKUS (*Rattus norvegicus*)

Rara Anggun Mei Nirbaya, Aulanni'am*, Chanif Mahdi

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya
Jl. Veteran Malang 65145

*Alamat korespondensi, Tel : +62-341-575838, Fax : +62-341-575835
Email: aulani@ub.ac.id

ABSTRAK

Tirosin kinase merupakan enzim yang digunakan untuk mentransfer fosfat. Aktivitas tirosin kinase penting dalam proses autofosforilasi spermatozoa dan aktivitasnya akan maksimal bila bekerja pada kondisi optimum. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui karakteristik dan berat molekul tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*). Tirosin kinase diisolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) dengan cara sentrifugasi dan ultrasonikasi. Pada penelitian ini kondisi optimum tirosin kinase diuji dengan variasi pH (6; 6,5; 7; 7,5 dan 8), temperatur (20; 25; 30; 35 dan 40)⁰C, waktu inkubasi (20; 25; 30; 35; dan 40) menit, dan untuk penentuan berat molekul digunakan metode SDS-PAGE. Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) pada pH 7, temperatur 35⁰C, waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas 0,263 unit dan berat molekul tirosin kinase sebesar 94,61 kDa. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa pH, temperature, dan waktu inkubasi memberikan pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas tirosin kinase.

Kata kunci : aktivitas tirosin kinase, berat molekul tirosin kinase, spermatozoa

ABSTRACT

Tyrosine kinase is an enzyme that is used to transfer phosphate. Tyrosine kinase activity is important in the process of autofosforilasi sperm and its activities will be maximum when the working conditions of optimum. Purpose of this study was to determine the characteristic and molecular weigh tyrosine kinase isolated spermatozoa rat. Tyrosine kinase isolated from spermatozoa rat (*Rattus norvegicus*) by centrifugation and ultrasonikasi technique. In this research experiment of conditions optimum tyrosine kinase with variations of pH (6; 6,5; 7; 7.5 and 8), temperature (20; 25; 30; 35 and 40)⁰C, incubation periods (20; 25; 30; 35; and 40) minutes, and for the determination of molecular weight used method of SDS-PAGE. The result of this research showed that the optimum activity tyrosine kinase from spermmatozoa rat (*Rattus norvegucus*) at pH 7, temperature 35⁰C, and 30 minutes incubation time with 0,263 unit activity and obtained by molecular weight 94,61 kDa. The result of statistic analyzed showed the variation of pH, temperature, and incubation time give an very obvious influence ($P < 0,01$) against activity of tyrosine kinase.

Keywords: molecular weight tyrosine kinase, spermatozoa, tyrosine kinase activity

PENDAHULUAN

Enzim merupakan senyawa protein, yang berfungsi sebagai katalis biologis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia yang terdapat dalam jaringan makhluk hidup [1]. Tirosin kinase merupakan salah satu enzim yang dapat memindahkan grup fosfat dari ATP ke residutirosin pada protein. Tirosin kinase merupakan subgrub dari kelas protein kinase [2]. Dalam spermatozoa, tirosin kinase merupakan salah satu protein membran plasma spermatozoa yang memiliki fungsi sebagai mediator pertemuan

antara spermatozoa dengan sel telur. Serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi dari residu tirosin [3]. Aktivitas tirosin kinase akan maksimum apabila bekerja pada kondisi optimum.

Dari penelitian [4], diketahui aktivitas tirosin kinase dari membran plasma spermatozoa sapi perah (FH) akan maksimum apabila bekerja pada kondisi optimum yaitu pH 7, temperatur 30⁰C, dan waktu inkubasi 30 menit. Berat molekul tirosin kinase dalam membran plasma spermatozoa sapi sebesar 95 kDa [5]. Dari uraian diatas maka perlu dilakukan penelitian tentang karakterisasi tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*). Perbedaan strain ini dimungkinkan adanya perbedaan aktivitas enzim tirosin kinase. Oleh karena itu perlu diketahui karakter tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) dengan mengetahui kondisi optimum yang meliputi pH, temperatur, waktu inkubasi serta berat molekul.

METODA PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan kimia yang digunakan: Sampel spermatozoa dari hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*), Adenosin Trifosfat (ATP), KCl, KH₂PO₄, Histon, trikloroasetat (Cl₃CCOOH), sukrosa (C₁₂H₂₂O₁₁), Tris base, imidazole (C₃H₄N₂, E. Merck, 64271 Darmstadt, Germany), Etanol absolut 99% (Merck), asam klorida (HCl), *Ammonium persulphate* ((NH₄)₂S₂O₈), N, N, N',N' tetramethyl ethylene diamine (TEMED, (CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂ Pharmacia Biotech), bromophenol blue, β-merkaptotetanol (C₂H₆O₅), running sample buffer (RSB), Comassie Brilliant Blue R-250, aquades steril.

Peralatan yang digunakan: seperangkat alat bedah, labu takar (10mL, 100mL), mikropipet, stirer, tabung mikro (eppendorf), freezer, neraca analitik (Sartorius basic P-160 kepekaan 0,0001 G/160G), alat sentrifugasi (Denley type-BR 401), vortex (Guo-Huq), pH meter, inkubator (memmert), sonikator (Branson 200), spektrofotometer UV-Vis, dan seperangkat alat elektroforesis protein II (Bio-rad).

Prosedur

Isolasi Tirosin Kinase

Sampel spermatozoa dimasukkan dalam mikrotub ditambah PBS, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Pelet sel dicuci dengan PBS sebanyak tiga kali dan ditambah sedikit pasir kuarsa, digerus dalam mortir dingin hingga halus. Ditambah PBST-PMSF sebanyak 5 kali volume larutan dan digerus hingga homogen. Cairan dimasukkan

dalam mikrotub. Disonikasi (220 Hz) selama 10 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Endapan dibuang, supernatan yang didapat ditambah etanol dingin 1:1. Dimasukkan refrigerator selama 12 jam. Disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, supernatan yang didapat dibuang sedangkan endapan dikering anginkan sampai bau dari etanol hilang. Isolat tirosin kinase ditambah buffer Tris-Cl perbandingan 1:1.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku ATP

Membuat larutan stok ATP dengan konsentrasi 125 ppm. Ditimbang 0,0125 g ATP, dilarutkan dengan buffer fosfat 0,1M dan diencerkan hingga 100mL. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan pengukuran absorbansi dari larutan ATP 125 ppm, menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada kisaran gelombang 230-280 nm. Dibuat grafik antara data absorbansi dan panjang gelombang (λ).

Larutan stock ATP 125 ppm dipipet secara berturut-turut 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, dan 480 μ L. Diencerkan dengan buffer fosfat 0,1M pH 7 sampai volume mencapai 1500 μ L, divorteks 1menit. Diperoleh konsentrasi ATP 0; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35; dan 40 ppm. Tiap larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum larutan ATP 125 ppm. Dibuat persamaan regresi dan kurva baku ATP antara absorbansi terhadap konsentrasi ATP.

Penentuan pH Optimum

Sebanyak 50 μ L isolat tirosin kinase ditambah 150 μ L Tris-HCl, 200 μ L ATP 125 ppm dalam larutan buffer fosfat dengan variasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8 dan 200 μ L histon 70 ppm dalam larutan buffer fosfat dengan variasi pH 6; 6,5; 7; 7,5; dan 8, diinkubasi pada temperatur 35⁰C selama 30 menit, ditambah 200 μ L TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat diambil 100 μ L dan ditambah Tris-HCl 1 mL. Supernatan ditentukan nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan data dianalisis untuk mendapatkan pH optimum.

Penentuan Temperatur Optimum

Sebanyak 50 μ L isolat tirosin kinase ditambah 150 μ L Tris-HCl, 200 μ L ATP 125 ppm pH 7, dan 200 μ L histon 70 ppm. Diinkubasi dengan variasi temperatur 20; 25; 30; 35; dan 40⁰C selama 30 menit. Ditambah 200 μ L TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat diambil 100 μ L, ditambah Tris-HCl 1 mL. Ditentukan temperatur optimum dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan data dianalisis untuk mendapatkan temperatur optimum.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Sebanyak 50 μL isolat tirosin kinase ditambah 150 μL Tris-HCl, 200 μL ATP 125 ppm pH 7, dan 200 μL histon 70 ppm. Diinkubasi pada temperatur 35°C selama variasi waktu inkubasi 20; 25; 30; 35; dan 40 menit. Ditambah 200 μL TCA 8% dan disentrifugasi 7000 rpm selama 15 menit. Substrat diambil 100 μL dan ditambah Tris-HCl 1 mL. Ditentukan temperatur optimum dengan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm dan data dianalisis untuk mendapatkan waktu inkubasi optimum.

Penentuan Berat Molekul Menggunakan Metode SDS-PAGE

1. Persiapan Gel

Dirangkai dua plat kaca dengan jarak antar plat ± 1 mm. Gel dibagi menjadi dua jenis yaitu gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*) dan gel sebagai tempat sampel (*stacking gel*). Kemudian dituangkan larutan *separating gel* dalam plat dan dituangkan pula akuades steril di atas gel, dibiarkan 10-30 menit. Setelah gel mulai memadat, akuades steril yang ada di atas gel tersebut dibuang. Dituangkan larutan *stecking gel* di atas *separating gel*. Sisiran dipasang hingga gel memadat dan terbentuk sumuran. Berikutnya setelah gel memadat, sisiran dilepas, plat dipasang pada alat elektroforesis “*set mini protein gel*” dan dituangkan dalam larutan running buffer pada alat tersebut.

2. Injeksi Sampel dan Running

Isolat tirosin kinase dipipet sebanyak 2 μL ditambah 13 μL Tris-Cl dan 15 μL RSB, dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit. Didinginkan pada temperatur kamar, kemudian disuntikkan ke dalam sumuran. Dilakukan running dengan arus 30 mA, 600 V. Proses pemisahan dihentikan setelah warna biru penanda $\pm 0,5$ cm dari batas bawah plat gel. Gel hasil running, direndam dalam larutan *staining* dishaker selama 30 menit, gel di pindah dan direndam dalam larutan *destaining*, dishaker selama 30 menit sampai bening. Pita-pita hasil elektroforesis discan dan ditentukan Berat molekul tirosin kinase, sehingga didapatkan data.

HASIL dan PEMBAHASAN

Penentuan Kondisi Optimum

Salah satu kondisi optimum yang sangat menentukan karakteristik tirosin kinase tersebut adalah pH, tinggi rendah pH dapat mempengaruhi aktivitas enzim, karena adanya perubahan konformasi gugus aktif pengikat substrat. Pada sisi aktif enzim tirosin kinase terjadi pelepasan proton pada gugus tiol (SH) yaitu sistein, sehingga atom S bersifat nukleofil dan akan berikatan dengan gugus fosfat yang berada di substrat. Pada pH 7 terjadi pelepasan

proton lebih banyak untuk menyeimbangkan banyak ion OH⁻ dilingkungannya, sehingga aktivitas enzim untuk mengikat fosfat menjadi maksimum. Pengaruh pH terhadap aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas tirosin kinase

pH	Rataan Aktivitas (unit)	Notasi
6	$0,095 \pm 1,6 \times 10^{-2}$	a
8	$0,098 \pm 0,777 \times 10^{-2}$	a
6,5	$0,198 \pm 0,702 \times 10^{-2}$	b
7,5	$0,2 \pm 0,346 \times 10^{-2}$	b
7	$0,225 \pm 0,436 \times 10^{-2}$	c

Aktivitas tirosin kinase dipengaruhi oleh pH (Tabel 1). Hasil analisis statistik perlakuan variasi pH memberikan pengaruh yang sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap aktivitas tirosin kinase. Pada pH 6 dan 8 memiliki kondisi optimum yang sama. Identifikasi pH 6; 6,5; 7,5 dan 8 terhadap uji variasi pH memiliki pengaruh yang berbeda. Namun, pada pH 7 menghasilkan aktivitas yang berbeda sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap pH yang lain. pH 7 menunjukkan aktivitas tertinggi, maka hasil ini menunjukkan bahwa pH 7 adalah pH optimum tirosin kinase dengan aktivitas sebesar 0,225 unit.

Pengujian pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) jantan dilakukan pada variasi temperatur 20, 25, 30, 35, dan 40°C. Pada umumnya aktivitas enzim terjadi pada temperatur berkisar pada 30-40°C dan akan mengalami denaturasi pada temperatur diatas 50°C [6]. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh temperatur terhadap aktivitas tirosin kinase

Temperatur (°C)	Rataan Aktivitas (unit)	Notasi
20	$0,13 \pm 0,611 \times 10^{-2}$	a
25	$0,16 \pm 0,656 \times 10^{-2}$	b
40	$0,215 \pm 1,007 \times 10^{-2}$	b
30	$0,216 \pm 1,40 \times 10^{-2}$	c
35	$0,24 \pm 0,611 \times 10^{-2}$	d

Temperatur 20, 30 dan 35 °C memberikan pengaruh sangat nyata ($p < 0,01$) terhadap temperatur 25 dan 40°C. Aktivitas tirosin kinase yang optimum dapat ditunjukkan pada temperatur 35°C. Dengan demikian, aktivitas optimum tirosin kinase yaitu temperatur 35°C dengan aktivitas sebesar 0,24 unit.

Aktivitas tirosin kinase mengalami peningkatan pada temperatur 20-35°C akan memperbesar energi kinetik sehingga frekuensi tumbukan antar molekul enzim dengan substrat semakin besar, maka produk meningkat sampai pada temperatur optimum.

Temperatur optimum ditunjukkan pada 35⁰C, dimana pada temperatur tersebut substrat bereaksi dengan enzim untuk menghasilkan produk secara maksimum dengan aktivitas enzim sebesar 0,24 unit. Hal ini sesuai pendapat [7], bahwa semakin tinggi temperatur, maka aktivitas enzim akan semakin besar sampai batas tertentu.

Waktu inkubasi merupakan waktu yang dibutuhkan oleh enzim untuk berikatan dengan substrat. Pengujian pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase dilakukan pada variasi waktu inkubasi 20, 25, 30, 35, dan 40 menit. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase dapat dilihat pada Tabel 3.

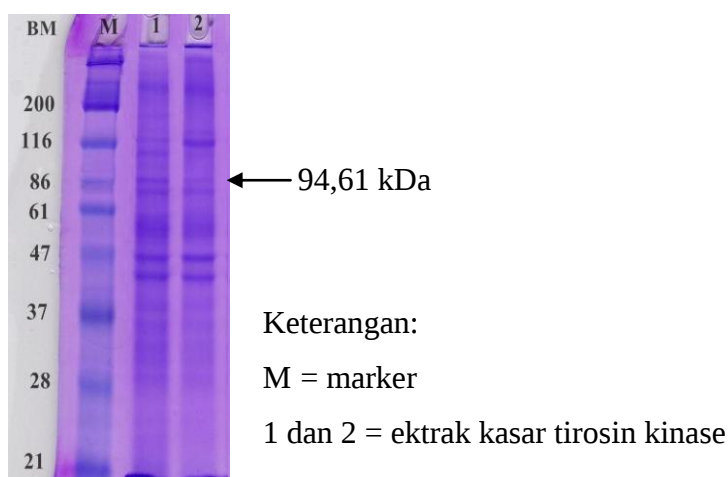
Tabel 3. Pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas tirosin kinase

Waktu inkubasi	Rataan Aktivitas (unit)	Notasi
20	$0,184 \pm 0,058 \times 10^{-2}$	a
40	$0,195 \pm 0,854 \times 10^{-2}$	b
25	$0,212 \pm 0,8 \times 10^{-2}$	c
35	$0,234 \pm 0,2 \times 10^{-2}$	d
30	$0,263 \pm 0,115 \times 10^{-2}$	e

Pada variasi waktu inkubasi 20-40 menit memberikan pengaruh sangat nyata ($P < 0,01$) terhadap aktivitas enzim. Aktivitas tirosin kinase yang optimum ada pada waktu inkubasi 30 menit. Hasil pada penelitian ini didapatkan bahwa kondisi optimum tirosin kinase hasil isolasi spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) mempunyai kondisi optimum pH 7, temperatur 35⁰C dan waktu inkubasi 30 menit dengan aktivitas sebesar 0,263 unit.

Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul tirosin kinase dengan metode SDS-PAGE, didasarkan pada pergerakan partikel bermuatan melalui suatu gel karena adanya pengaruh medan listrik. Hasil elektroforesis yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 1:



Gambar 1. Pita protein hasil elektroforesis

Hasil elektroforesis ekstrak kasar spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) pada pita ke-4 dengan berat molekul 94,61 kDa diyakini sebagai berat molekul enzim tirosin kinase, karena sesuai pendapat [5] berat molekul tirosin kinase yang di temukan dari hasil isolasi spermatozoa sapi yaitu sebesar 95 kDa.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum aktivitas tirosin kinase hasil isolasi dari spermatozoa tikus (*Rattus norvegicus*) yaitu pada pH optimum 7, temperatur optimum 35°C, dan waktu inkubasi optimum 30 menit dengan aktivitas sebesar 0,263 unit, dengan berat molekul 94,61 kDa.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada kepala laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya yang telah memfasilitasi dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Muchtadi D.S., Palupi N. S., Dan Astawan M., 1992. Enzim Dalam Industri Pangan, PAU Pangan Dan Gizi, Institut Pertanian Bogor.
2. Muhaiminrifai, 2011, Buku Ajar Fisiologi I, Universitas Brawijaya, Malang.
3. Leyton, L., P. Leguen, D. Bunch and P. M. Saling., 1992. Regulation of Mouse Gamete Interaction by a Sperm Tyrosin Kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89. 11692 – 11695.
4. Madyawati, S. P. dan P. Srianto, 2007, Optimasi Aktivitas Tyrosin Kinase Hasil Isolasi Dari Spermatozoa Sapi Perah Frisian Holstein (FH), Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Vol. 23, No. 3
5. Aitken, R.J., D. Harkiss, W. Knox, M. Peterson and D.S Irvine, 1998, A Novel Transduction cascade in Capacitating Human Spermatozoa Characterised by a Redox-regulated, camp-mediated Induction Of Tyrosine Phosphorylation, MRC Reproductive Biology Unit. 27 Chalmers Street, Edinburgh EH3 9EQ, Scotland. Pp.645-654.
6. Lehninger, A.L., 1995, Dasar-Dasar Biokimia, Ahli Bahasa: Maggy Tenawijaya, Erlangga, Jakarta.
7. Winarno, 1986, Enzim Pangan, Cetakan ke -3, Penerbit PT. Gramedia, Pustaka Utama, Jakarta.