

PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE



LAPORAN PENELITIAN  
DOSEN MUDA TAHUN ANGGARAN 2003

KK  
KKC  
572.79  
Pur  
k

**KLONING DAN OVER EKSPRESI GEN PROTEIN DISULFIDA  
ISOMERASE RAGI SACHAROMYCES CEREVISIAE DI  
ESCHERICHIA COLI**

Oleh:

Purkan, S.Si., M.Si.



\*007404141\*

MILIE  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

007404141

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi  
DIP Nomor : 006/XXIII/1/--/2003 Tanggal 1 Januari 2003  
Kontrak Nomor : 032/P4T/DPPM/PDM/III/2003  
Ditbinlitabmas, Ditjen Dikti, Depdiknas  
Nomor Urut 41

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2003


## LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

1. Judul penelitian : Kloning dan over ekspresi gen protein disulfida isomerase ragi *Saccharomyces cerevisiae* di *Escherichia coli*
- a. Bidang Ilmu : Biokimia  
b. Kategori penelitian : I/ II / III
2. Ketua Peneliti  
a. Nama : Purkan, M.Si  
b. Jenis Kelamin : Laki-laki  
c. Golongan Pangkat & NIP : III-C / 132161176  
d. Jabatan Fungsional : Lektor  
e. Jabatan Struktural : Penata  
f. Fakultas/Jurusan/Puslit : FMIPA/ Jurusan Kimia/UNAIR Surabaya  
g. Pusat Penelitian : UNAIR Surabaya
3. Jumlah Tim Peneliti : 1 (Satu) orang
4. Lokasi Penelitian : Lab. Kimia Organik-Biokimia, FMIPA-UNAIR
5. Kerjasama dengan Instansi Lain  
a. Nama Instansi : -  
b. Alamat : -
6. Lama Penelitian : Tiga tahap, masing-masing tahap 10 bulan
7. Biaya Penelitian  
Biaya Tahun I : Rp. 6.000.000,-  
Biaya Tahun II : -  
Biaya Tahun III : -


Mengetahui  
Dekan FMIPA UNAIR

  
Drs. H.A. Latief Burhan, M.S  
NIP. 131 286 709

Surabaya, 19 Oktober 2003  
Ketua Peneliti

  
Purkan, S.Si., M.Si  
NIP. 132 161 176

Mengetahui  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Airlangga

  
Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S  
NIP. 130 701 125

## RINGKASAN

**KLONING DAN OVER EKSPRESI GEN PROTEIN DISULFIDA ISOMERASE RAGI *Saccharomyces cerevisiae* DI *Escherichia coli***  
(Purkan, 2003, 29 halaman)

Protein disulfida isomerase (PDI, E.C.5.3.4.1) yang dikode oleh gen *PDI1* ragi adalah suatu enzim yang berfungsi mengkatalisis reaksi pembentukan dan penataan ulang (isomerisasi) ikatan disulfida dalam proses *folding* polipeptida suatu protein ekstraselular atau protein jalur sekresi. Selain itu juga merupakan molekul chaperon yang membantu proses pelipatan protein di dalam retikulum endoplasma, dengan cara menghambat pembentukan ikatan disulfida selama *folding* polipeptida sehingga pembentukannya tidak terjadi secara random. PDI mengarahkan pembentukan ikatan disulfida tersebut dapat terjadi diantara pasangan residu sistein yang tepat, sehingga menghasilkan molekul protein dengan struktur tersier yang *native*. PDI juga merupakan komponen dari dua enzim multimer prolil-4-hidroksilase dan protein kompleks pentransfer trigliserida mikrosom (Freedman *et al.*, 1994).

Fungsi PDI sebagai enzim dan molekul chaperon, mendasari aplikasi PDI dalam bidang kedokteran, industri makanan, farmasi maupun industri kimia lainnya. Penggunaan PDI yang beragam menuntut penyediaannya dalam skala besar. Ragi *Saccharomyces cerevisiae* menghasilkan PDI kurang dari 0.05 % dari total protein sel (Mizunaga *et al.*, 1990). Rendahnya kadar PDI ragi ini memerlukan upaya over produksi PDI sehingga ketersediaannya dapat memenuhi kebutuhan di banyak industri.

Penelitian ini dirancang untuk melakukan over produksi enzim protein disulfida isomerase (PDI) ragi *Saccharomyces cerevisiae* di *Escherichia coli*. Penelitian ini akan diawali dengan mengamplifikasi dan mengklon gen protein disulfida isomerase ragi (*PDI1*) di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Permasalahan penelitian pada tahap awal ini adalah : apakah gen PDI ragi dapat diamplifikasi dengan PCR, berapakah ukuran molekul gen *PDI1*, apakah penyambungan gen *PDI1* ke vektor pGemT dapat menghasilkan rekombinan pGemT-*PDI1*, dan apakah rekombinan tersebut dapat diklon di *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

Penelitian tahap awal ini bertujuan untuk mengamplifikasi gen protein disulfida isomerase dengan PCR, menentukan ukuran gen hasil PCR, dan mendapatkan rekombinan pGem-T-*PDII* dalam klon *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Kloning gen Protein disulfida isomerase ragi di *E. coli* DH5 $\alpha$  dikerjakan dengan cara mengamplifikasi gen PDI ragi menggunakan PCR. Amplikon hasil PCR selanjutnya diligasi dengan vektor kloning (plasmid pGem-T) untuk mendapatkan DNA rekombinan pGem-T-*PDII*. DNA rekombinan hasil konstruksi ini, kemudian digunakan untuk menstransformasi *E. coli* DH5 $\alpha$ . Seleksi transforman dilakukan untuk mendapatkan klon *E. coli* DH5 $\alpha$  [pGemT-*PDII*].

Amplifikasi gen *PDII* ragi dengan dua buah primer, yaitu primer *forward* dan primer *reverse* menggunakan PCR telah berhasil mendapatkan suatu fragmen DNA berukuran  $\pm 1700$  pb. Sementara itu, ligasi amplikon hasil PCR dengan vektor T (pGem T) dapat menghasilkan rekombinan pGemT-*PDII* di dalam *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Karakterisasi pemotongan rekombinan pGemT-*PDII* dari beberapa transforman *E. coli* dengan enzim restriksi *NdeI* dan *BamHI* menunjukkan bahwa gen *PDII* telah berhasil terklon di *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Kesimpulan dari penelitian ini adalah bahwa fragmen DNA berukuran  $\pm 1700$  pb yang ekuivalen dengan ukuran gen *PDII* dapat dihasilkan dari amplifikasi gen *PDII* ragi menggunakan PCR. Sebuah fragmen DNA ( $\pm 4700$  pb) hasil pemotongan pGem T rekombinan oleh enzim tunggal *NdeI*, dan *BamHI*, serta dua fragmen DNA ( $\pm 3000$  pb) dan ( $\pm 1700$  pb) hasil pemotongan oleh dua enzim *NdeI* dan *BamHI*, menunjukkan bahwa rekombinan pGemT-*PDII* telah terkontruksi dan berhasil terklon di *E. coli* DH5 $\alpha$ . Saran penelitian ini adalah perlunya melakukan penentuan urutan nukleotida gen *PDII* yang telah diamplifikasi dan juga meng-over ekspresikan gen tersebut baik di *E. coli* maupun di ragi.

## SUMMARY

### **CLONING AND OVER EXPRESSION OF PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE GENE OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST IN *Escherichia coli*** (Purkan, 2003, 29 pages)

---

Protein disulfide isomerase (PDI, E.C.5.3.4.1) encoded by *PDI1* gene of yeast is an enzyme that catalyze the formation and arrangement of disulfide bond on process of polypeptide folding an extracellular or secretion pathway protein. Moreover, it is a chaperon molecule too, that help folding process of protein in endoplasmic reticulum by blocking method the formation of disulfide bond in order to not occur randomly. PDI orders formation of the disulfide bond to occur on exact cystein residues partner, so it can produce protein molecule with native tertiary structure. PDI is also the component of two multimeric enzymes, prolyl-4-hydroxylase and complex protein of microsomal triglyceride transferred (Freedman *et al.*, 1994).

The function of PDI as an enzyme and chaperon serve as a basis for application of PDI on industries of medical, food, pharmacy and other chemical industries. Various applications of PDI require its availability on large scale. A wild type of *Saccharomyces cerevisiae* yeast produce PDI less than 0.05 % of whole proteins of yeast cell. The low concentrate of yeast PDI need an effort to over production of PDI to cover PDI demands in many industries.

The research was designed to over production of protein disulfide isomerase enzyme (PDI) of *Saccharomyces cerevisiae* yeast in *Escherichia coli*. The research will be begun with amplifying and cloning of protein disulfide isomerase gene of *Saccharomyces cerevisiae* yeast (*PDI1*) in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

The problems of the first research are : weather the yeast PDI gene can be amplified by PCR, how much is the molecule size of the gene, weather the ligation of *PDI1* gene with pGemT vector can produce pGemT-*PDI1* recombinant, and weather the pGemT-*PDI1* recombinant can be cloned in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

The aims of the first research are : to amplify the protein disulfide isomerase gene by PCR, to state the size of gene resulted by PCR, to obtain pGemT-*PDI1* recombinant in a clone of *E. coli* DH5 $\alpha$ .

Cloning of yeast protein disulfide isomerase gene in *E. coli* DH5 $\alpha$  was done by amplification of yeast *PDII* gene with PCR. The amplicon was resulted by PCR, soon ligated with cloning vector (pGemT plasmid) to obtain recombinant DNA of pGemT-*PDII*. Recombinant DNA that resulted by the construction was used to transform *E. coli* DH5 $\alpha$ . Selection of transformants were done to obtain a clone of *E. coli* DH5 $\alpha$  [pGemT-*PDII*].

Amplification of yeast *PDII* gene with two primers, namely forward and reverse primers using PCR have produce a DNA fragmen sized  $\pm$  1700 bp. At the moment, ligation of amplicon resulted by PCR with T vector (pGemT) can produce pGemT-*PDII* recombinant in *Eschericia coli* DH5 $\alpha$ . Digesty characterization of pGemT-*PDII* recombinant from some *E. coli* transformas with *Nde*I and *Bam*HI restriction enzymes showed that *PDII* gene have been cloned in *E. coli* DH5 $\alpha$ .

The conclutions of the research are DNA fragment size of  $\pm$  1700 bp that equivalence with the size of *PDII* gene have been obtained from amplification of yeast *PDII* gene with PCR. A DNA fragment ( $\pm$  4700 bp) was resulted by digestion of recombinant pGemT with single enzyme, *Nde*I, and *Bam*HI, and two DNA fragment ( $\pm$  3000 bp) and ( $\pm$  1700 bp) was resulted by digestion with both enzymes showed that *PDII* gene have been conctructed and cloned in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Suggestions of this research are : it will be important to sequence nucleotides of *PDII* gene that be resulted by amplification, and to make over expression the gene both in *E. coli* or yeast.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmatNYA sehingga penelitian yang berjudul “ Kloning dan Over Ekspresi Gen Protein Disulfida Isomerase Ragi *Saccharomyces cerevisiae* Di *Escherichia coli* “ ini dapat diselesaikan.

Pada kesempatan yang sama peneliti mengucapkan terima kasih kepada :

1. Direktorat Jenderal Perguruan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional, Jakarta, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian
3. Dekan Fakultas MIPA Universitas Airlangga, yang telah memberi kesempatan dan fasilitas penelitian
4. Kepala Laboratorium Kimia Organik-Biokimia dan Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Airlangga
5. Semua pihak yang telah membantu kelancaran penelitian.

Semoga penelitian ini dapat memberikan manfaat.

Surabaya, Oktober 2003

Peneliti

## DAFTAR ISI

	Hal
RINGKASAN	i
SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b>	
1.1. Latar Belakang Permasalahan	1
1.2. Rumusan Permasalahan	4
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1. Katalisis Pembentukan Ikatan Disulfida Oleh PDI dalam Folding Polipectida	5
2.2. PDI Sebagai Protein Multifungsi	6
2.3. PDI Mamalia	9
2.4. PDI <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
<b>BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b>	
3.1. Tujuan Penelitian	14
3.2. Manfaat Penelitian	14



BAB IV.	METODE PENELITIAN	15
4.1.	Sampel Penelitian	15
4.2.	Bahan dan Alat	15
4.3.	Cara Kerja	15
4.3.1.	Peremajaan <i>Escherichia coli</i>	16
4.3.2.	Isolasi DNA plasmid skala kecil	17
4.3.3.	Amplifikasi gen <i>PDII</i> Ragi menggunakan PCR	17
4.3.4.	Isolasi fragmen DNA dari gel agarosa	18
4.3.5.	Elektroforesis gel agarosa fragmen DNA	18
4.3.6.	Ligasi gen <i>PDII</i> dengan vektor pGem T	19
4.3.7.	Transformasi <i>E.coli</i> dengan DNA plasmid	20
4.3.8.	Pemotongan DNA plasmid dengan enzim restriksi	20
BAB V.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1.	Penyiapan Plasmid dan Analisis Restriksi	21
5.2.	Hasil Amplifikasi Gen <i>PDII</i> Menggunakan PCR	22
5.3.	Kloning Gen <i>PDII</i> di <i>Escherichia coli</i> Menggunakan vektor T	24
BAB VI.	KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1.	Kesimpulan	26
6.2.	Saran	26
	DAFTAR PUSTAKA	27

## DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1 Struktur domain PDI manusia	10
Gambar 5.1 Hasil analisis restriksi plasmid pRS314- <i>PDII</i>	22
Gambar 5.2 Hasil amplifikasi gen <i>PDII</i> dengan PCR	23
Gambar 5.3 Hasil pembentukan rekombinan pGemT- <i>PDII</i> dan analisis restriksinya	24

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang Permasalahan

Pelipatan (*Folding*) rantai polipeptida merupakan tahapan penting dalam proses biosintesis protein, sebab melalui proses ini konformasi struktur protein dibangun sehingga sangat menentukan fungsional tidaknya dari molekul protein yang dihasilkan. Kegagalan pembentukan struktur protein yang khas dan fungsional dalam kondisi fisiologis dapat memicu timbulnya beragam penyakit seperti timbulnya kanker, katarak, Parkinson, *cystic fibrosis*, *Alzheimer* dan masih banyak yang lainnya (Phillip *et al*,1995). Kemampuan polipeptida untuk membentuk struktur protein yang khas, fungsional dan stabil dalam kondisi fisiologis sangat ditentukan oleh urutan residu asam amino penyusun polipeptida, adanya molekul chaperon dan enzim pengkatalis proses *foldin*.

Protein disulfida isomerase (PDI, E.C.5.3.4.1) adalah suatu protein dengan multifungsi. Pertama sebagai enzim yang berfungsi mengkatalisis reaksi pembentukan dan penataan ulang (isomerisasi) ikatan disulfida dalam proses *foldin* polipeptida suatu protein ekstraselular atau protein jalur sekresi. Kedua sebagai molekul chaperon yang dapat membantu proses pelipatan protein di dalam retikulum endoplasma, dan ketiga merupakan komponen dari dua enzim multimer prolil-4-hidroksilase dan protein kompleks pentransfer trigliserida mikrosom (Freedman *et al*,1994).



Pembentukan ikatan disulfida dalam rantai polipeptida sangat menunjang kestabilan struktur tersier protein. Secara termodinamika pembentukan ikatan disulfida ini dapat berlangsung secara spontan diantara pasangan residu sistein penyusun polipeptida. Akan tetapi di dalam sel, kelangsungan proses spontan ini dihambat oleh suatu protein pengendali yang disebut chaperon (Mathew *et al.*, 1996).

PDI sebagai molekul chaperon berperan menghambat pembentukan ikatan disulfida dalam *folding* polipeptida agar tidak terjadi secara random. PDI mengarahkan pembentukan ikatan disulfida tersebut untuk dapat terjadi diantara pasangan residu sistein yang tepat, sehingga menghasilkan molekul protein dengan struktur tersier yang *native*.

Fungsi PDI sebagai enzim dan molekul chaperon, mendasari aplikasi PDI dalam bidang kedokteran, industri makanan, farmasi maupun industri kimia lainnya. Dalam bidang kedokteran, aplikasi PDI lebih ditujukan untuk kepentingan terapi. Dalam hal ini, PDI dimanfaatkan untuk membenahi struktur polipeptida yang salah, sehingga efek penyakit yang ditimbulkan oleh struktur protein yang salah tersebut dapat disembuhkan. Dalam industri makanan, PDI banyak digunakan sebagai pengembang, antikoagulan dan pengawet produk-produk makanan. Sedang dalam industri farmasi, PDI dimanfaatkan sebagai anti oksidan yang aktif dari produk-produk kecantikan seperti kosmetik, *sun cream*, *shampo* dan lain-lain (Laboissiere *et al.*, 1995). Penggunaan PDI yang beragam menuntut penyediaannya dalam skala besar.

Enzim protein disulfida isomerase dapat dihasilkan oleh berbagai sumber, diantaranya adalah mamalia, *Clamydomonas reinhardi*, *Aspergillus niger*,

*Saccharomyces cerevisiae* dan sebagainya. PDI dari berbagai organisme eukariot merupakan protein dengan dua subunit berbentuk homodimer, masing-masing subunit mengandung dua sisi aktif dengan urutan asam amino Cys-Gly-His-Cys (Mizunaga *et al.*,1990).

PDI ragi sangat baik digunakan sebagai model dalam mempelajari fungsi biokimia PDI secara *in vivo*, sebab *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme eukariot yang paling sederhana, bersifat non patogen, mudah berbiak dan telah diketahui sistem genetiknya sehingga mudah dimanipulasi. Dalam ragi ini, PDI didapatkan dalam kadar yang kurang dari 0.05 % dari total protein sel (Mizunaga *et al.*,1990). Rendahnya kadar PDI ragi ini memerlukan upaya over produksi PDI sehingga ketersediaannya dapat memenuhi kebutuhan di banyak industri.

Dalam penelitian ini akan dilakukan over produksi enzim protein disulfida isomerase (PDI) dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* di *Escherichia coli*. Penelitian akan diawali dengan kloning gen protein disulfida isomerase *Saccharomyces cerevisiae* di *E. coli* DH5 $\alpha$ , dan dilanjutkan dengan over ekspresi gen tersebut di *E. coli* BL21 DE3 menggunakan vektor ekspresi serta karakterisasi enzim PDI hasil over-produksi pada tahap penelitian berikutnya.

Kloning gen Protein disulfida isomerase ragi di *E. coli* DH5 $\alpha$ , dikerjakan dengan cara mengamplifikasi gen PDI ragi menggunakan PCR. Amplikon hasil PCR selanjutnya diligasi dengan vektor kloning (plasmid pGem-T) untuk mendapatkan DNA rekombinan pGem-T-PDI. DNA rekombinan hasil konstruksi ini, kemudian digunakan untuk menstransformasi *E. coli* DH5 $\alpha$ . Seleksi transforman dilakukan untuk mendapatkan klon positif.

## 1.2. Rumusan Permasalahan

Permasalahan penelitian pada tahun pertama ini adalah :

1. Apakah gen PDI ragi dapat diampikasi dengan PCR dan berapakah ukuran molekulnya ?
2. Apakah klon *E.coli* yang mengandung rekombinan pGem-T-PDII dapat dihasilkan dan bagaimana karakteristik dari rekombinan pGem-T-PDII dalam klon tersebut ?

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Katalisis Pembentukan Ikatan Disulfida Oleh PDI dalam *Folding* Polipeptida

Ikatan disulfida banyak ditemukan dalam protein-protein ekstraselular, protein permukaan sel dan protein jalur sekresi, seperti albumin, immunoglobulin dan prokolagen. Adanya ikatan disulfida dalam molekul protein tersebut, baik secara intra ataupun intermolekular sangat penting dalam menunjang fungsi dan kestabilan protein selama proses pematangan dan transpor intrasel.

Di dalam sel biologis, pembentukan ikatan disulfida dalam *folding* polipeptida melibatkan sejumlah enzim dan molekul chaperon seperti protein disulfida isomerase (PDI, EC 5.3.4.1) (Anfinsen *et al.*, 1973).

Secara *in vivo*, pembentukan ikatan disulfida dapat berlangsung secara cepat dan akurat. Sebagai contoh 17 ikatan disulfida dalam albumin tikus dapat dibentuk dalam waktu 30 detik setelah molekul proalbumin dibebaskan dalam RE, sedangkan reduksi proalbumin untuk menghasilkan molekul albumin dengan ikatan disulfida yang tepat secara *in vitro* memerlukan waktu beberapa jam (Peter *et al.*, 1982).

Bardwell dan Beckwith menyusun suatu model pembentukan ikatan disulfida oleh PDI dalam *folding* polipeptida yang terjadi secara *in vivo* (Natalia, 1994). Ketika polipeptida hasil sintesis memasuki lumen RE, rantai polipeptida ini sebagai substrat akan dikenal dan diikat oleh PDI. PDI dalam keadaan teroksidasi kemudian menyerang residu sistein substrat polipeptida, sehingga terbentuklah kompleks PDI-polipeptida melalui ikatan disulfida yang tidak stabil. Rantai polipeptida dalam kompleks ini

selanjutnya melipat dengan ketepatan pelipatan yang dibantu dan diarahkan oleh informasi yang terdapat pada rantai polipeptida. Ikatan disulfida campuran ini sangat reaktif, sehingga dapat menyerang residu sistein yang lain pada polipeptida substrat. Ikatan disulfida antara PDI dengan polipeptida, kemudian dipindahkan untuk terjadi secara intramolekuler di dalam polipeptida substrat tersebut.

Setelah pembentukan dan isomerisasi ikatan disulfida berlangsung sempurna, maka PDI dibebaskan. PDI yang dibebaskan ini berada dalam bentuk tereduksi, dan kemudian dioksidasi kembali oleh sistem bufer redoks GSSG/GSH yang terdapat pada retikulum endoplasma. Pembentukan ikatan disulfida ini tidak terjadi di sitosol, melainkan terjadi di retikulum endoplasma. Lingkungan sitosol cenderung bersuasana tereduksi, dengan rasio GSH/GSSG berkisar dari 30:1 sampai 100:1. Sedangkan retikulum endoplasma memiliki rasio GSH/GSSG sekisar 3:1. Kondisi RE yang lebih teroksidasi ini sangat disukai untuk pembentukan ikatan disulfida tersebut.

Hampir semua model pembentukan ikatan disulfida di RE menunjukkan bahwa pembentukan dan isomerisasi ikatan disulfida yang dikatalisis oleh PDI melibatkan oksidan. Oksidan diperlukan untuk mengoksidasi substrat protein secara random sehingga PDI dapat berfungsi sebagai isomerase, atau untuk mengoksidasi kembali PDI yang telah mengkatalisis reaksi oksidasi pada protein tereduksi. Semua jenis oksidan dalam pembentukan ikatan disulfida di RE masih terus diteliti terutama untuk menentukan sistem redoks dan jalur alir elektron dalam sistem tersebut.

## 2.2 PDI Sebagai Protein Multifungsi

PDI merupakan protein yang memiliki multifungsi. Selain berfungsi sebagai katalis pada proses pembentukan, pemutusan dan isomerisasi ikatan disulfida, PDI juga



dapat membentuk kompleks dengan protein prolil-4-hidroksilase dan protein pentransfer trigliserida. PDI mempunyai kemampuan mengikat peptida dan protein, serta berfungsi juga sebagai molekul chaperon.

Prolil-4-hidroksilase (EC 1.14.11.2) adalah enzim berbentuk tetramer  $\alpha_2\beta_2$ , dan berfungsi mengkatalisis proses hidroksilasi prolin menjadi 4-hidroksi prolin pada kolagen. Subunit  $\alpha$  memiliki berat molekul 64 kDa, sedangkan subunit  $\beta$  60 kDa. Subunit  $\beta$  dari prolil-4-hidroksilase manusia menunjukkan kesamaan residu asam amino 94 % dengan PDI tikus. Fungsi subunit  $\beta$  adalah untuk mempertahankan agar enzim prolil-4-hidroksilase berada dalam retikulum endoplasma. Pemotongan urutan KDEL pada ujung terminal C polipeptida prolil-4-hidroksilase mengakibatkan sekresi polipeptida  $\beta$  (PDI) dan tetramer  $\alpha_2\beta_2$  yang aktif. Aktivitas PDI (subunit  $\beta$ ) tidak diperlukan untuk penggabungan tetramer dan aktivitas prolil-4-hidroksilase tetramer tersebut. PDI diperlukan untuk mempertahankan agar subunit  $\alpha$  tetap aktif dengan mencegah terjadinya agregasi.

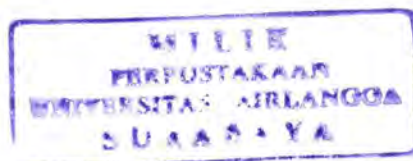
Protein pentransfer trigliserida mikrosom (*microsomal triglyceride transfer protein*, MTP) merupakan protein retikulum endoplasma yang berfungsi mentransfer trigliserida, ester kolesterol dan fosfatidilkolin. MTP yang memiliki berat molekul 150 kDa tersusun dari satu subunit 58 kDa dan satu subunit 88 kDa. Penggabungan PDI pada subunit 88 kDa MTP diperlukan untuk mempertahankan aktivitas dan mencegah terjadinya agregasi dari MTP tersebut.

PDI mempunyai kemampuan mengikat peptida. Afinitas pengikatannya sebanding dengan panjang peptida, semakin panjang rantai peptida semakin besar afinitasnya. Afinitas pengikatan ini juga diperbesar oleh adanya residu sistein pada peptida. Dengan

panjang yang sama, afinitas PDI terhadap peptida yang mengandung sistein 4-8 kali lebih besar dari pada afinitas PDI terhadap peptida yang tidak mengandung residu sistein. Aktivitas pengikatan peptida ini tidak berkaitan dengan aktivitas isomerisasi PDI, tetapi berkaitan dengan domain retensi pada retikulum endoplasma yang terletak di ujung terminal C.

Di samping aktivitas pengikatan peptida, PDI juga memiliki aktivitas mengikat protein, baik protein tersebut mengandung residu sistein maupun tidak. Tetapi aktivitas pengikatannya hanya terbatas pada protein linier (polipeptida) atau protein yang melipat sebagian (*partially folded*).

Molekul chaperon adalah protein yang mengkatalisis pelipatan dan penyusunan polipeptida menjadi protein tersier tanpa melibatkan modifikasi ikatan kovalen. PDI sebagai molekul chaperon berfungsi untuk mencegah terjadinya agregasi molekul protein seperti fungsinya dalam protein MTP dan prolil-4-hidroksilase di atas. Fungsi PDI sebagai chaperon diketahui dari hasil penelitian bahwa PDI dapat bergabung dengan *misfolded* lisozim manusia, yaitu protein ekstraselular dengan 4 ikatan disulfida. Sebaliknya PDI tidak dapat bergabung dengan lisozim *wild type*. Pengikatan PDI pada *misfolded* lisozim manusia hanya berlangsung sementara, yaitu sampai lisozim disekresi ke badan golgi atau sebelum lisozim tersebut selesai didegradasi. *Refolding* lisozim melalui oksidasi oleh PDI secara *in vitro* menunjukkan bahwa PDI konsentrasi tinggi dapat mencegah terjadinya agregasi serta memacu terjadinya *folding* yang tepat dari lisozim yang terdenaturasi (Natalia, 1994).



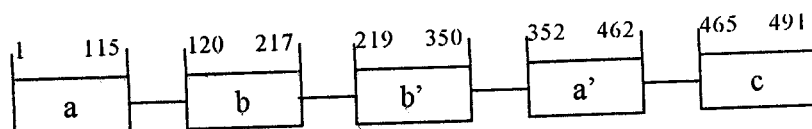
### 2.3 PDI Mamalia

Urutan residu asam amino PDI yang lengkap ditentukan pertama kali dari cDNA PDI tikus (Edman *et al.*, 1985). Dalam jaringan mamalia, PDI mempunyai kadar 0,8 % dari total protein sel. Gen atau cDNA PDI dari beberapa organisme eukariot yang berbeda telah diklon dan dikarakterisasi. Setelah pelepasan peptida sinyal, rantai polipeptida PDI mamalia tersusun atas sekitar 500 residu asam amino.

Struktur PDI hasil difraksi sinar X dengan resolusi tinggi belum dapat ditentukan, maka struktur molekul PDI dipetakan melalui prediksi urutan residu asam amino PDI dan pendekatan struktur dengan resolusi rendah, serta analisis homologi dengan tioredoksin, suatu protein kecil yang berperan aktif pada proses reduksi-oksidasi dalam sitoplasma (Freedman *et al.*, 1994). Adanya daerah-daerah yang menunjukkan pengulangan urutan residu asam amino secara internal, serta adanya struktur intron-ekson dalam gen PDI manusia, membuktikan bahwa PDI merupakan suatu protein modul. Polipeptida PDI tersusun atas lima atau enam modul yang dinyatakan sebagai a-e-b-b'-a'-c. Hasil analisis proteolisis dan ekspresi fragmen rekombinan menunjukkan bahwa modul a, b, b',a' dan c membentuk struktur domain, sedangkan modul e tidak menunjukkan struktur domain yang jelas.

Struktur PDI manusia yang diprediksi dari urutan residu asam amino polipeptidanya menunjukkan bahwa 17-22 residu asam amino pertama bersifat hidrofobik dan khas sebagai peptida sinyal. PDI manusia mempunyai dua daerah yang menunjukkan homologi asam amino internal, yaitu domain a dan a'. Dua daerah ini (domain a dan a') mempunyai sisi aktif *putative* WCGHC yang diperlukan untuk reaksi pembentukan ikatan disulfida. PDI manusia juga menunjukkan adanya pengulangan

daerah dengan homologi internal yang kuat, tetapi tidak mempunyai kesamaan residu asam amino yang cukup berarti. Daerah ini disebut sebagai domain b dan b'. Daerah ujung terminal C PDI manusia (domain c) mengandung 50% residu asam amino yang bersifat asam. Domain c mempunyai urutan residu asam amino KDEL yang berfungsi sebagai sisi retensi PDI dalam lumen retikulum endoplasma. Domain c juga merupakan tempat pengikatan kalsium (Freedman *et al.*, 1994).



**Gambar 2.1. Struktur domain PDI manusia (Klappa *et al.*, 2000)**

Domain a dan a' cukup efektif sebagai katalis dalam reaksi redoks sederhana, yaitu oksidasi reduksi gugus thiol-disulfida. Sedangkan dalam reaksi yang kompleks, yaitu isomerisasi ikatan disulfida dalam *folding* protein, diperlukan keterlibatan domain-domain yang lain (b, b' dan c). Fragmen PDI multidomain mempunyai aktivitas katalitik lebih tinggi dibandingkan dengan aktivitas fragmen tunggal, seperti domain a atau a'. Fragmen PDI terkecil yang dibutuhkan untuk dapat melakukan penataan ulang (isomerisasi) ikatan disulfida secara efisien adalah domain b'-a'-c (Darby *et al.*, 1998).

Domain b' cukup memadai sebagai sisi pengikatan peptida kecil, sedangkan untuk *misfolded polypeptide* dan peptida besar (lebih dari 28 residu asam amino), domain b' tetap sangat penting tetapi tidak memadai untuk pengikatan yang efisien, sehingga memerlukan domain tambahan (Klappa *et al.*, 1998)

#### 2.4. PDI *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* sangat baik digunakan sebagai model dalam mempelajari fungsi PDI di dalam sel eukariot, sebab *Saccharomyces cerevisiae* merupakan organisme eukariot yang paling sederhana, tidak patogen dan mudah berbiak. Selain itu sistem genetik ragi cukup dikenal sehingga mudah dimanipulasi.

Penelitian yang mengkarakterisasi PDI ragi telah dilakukan Mizunaga (1990). PDI ragi mempunyai kadar 0,05 % dari total protein sel ragi. PDI ragi tersusun atas dua subunit berbentuk homodimer, dimana masing masing subunit mempunyai berat molekul 70 kDa. Berat molekul subunit ini menurun menjadi 60 kDa, ketika PDI ragi diperlakukan dengan enzim endoglukosamidase H. Gejala ini menunjukkan bahwa PDI ragi terglukosilasi ( N-glikosilasi ) dengan berat total molekul gula sebesar 10 kDa. Berat molekul sebuah oligosakarida yang terikat pada sub unit PDI ini diperkirakan 2,0 kDa, dengan demikian terdapat 4-6 oligosakarida yang terikat pada subunit PDI ragi. Sisi glikosilasi pada PDI terdapat pada urutan residu asam amino Asn-XXXX-Ser/Thr. PDI ragi mempunyai pH isoelektrik sebesar 4,02, dan pH optimum dalam reaksi isomerisasi ikatan disulfida *sRNase* sebesar 8,5. Sifat kinetik menunjukkan bahwa enzim ini memiliki  $V_{maks}$  6 unit / mg protein dengan  $K_m$  sebesar  $1 \times 10^{-5}$  M terhadap substrat *sRNase*.

PDI ragi dikode oleh gen kopi tunggal, yang disebut gen *PDI 1* dan mengkode 522 residu asam amino (Tachikawa, *et al.*, 1991). Pada ujung terminal N PDI terdapat residu asam amino bersifat hidrofobik, berfungsi sebagai sinyal peptida, yaitu mengarahkan PDI yang telah disintesis di ribosom bermigrasi ke retikulum endoplasma sel. Sedangkan ujung terminal C mengandung banyak residu asam amino bersifat asam, dan juga tetra peptida dari urutan residu asam amino HDEL, berfungsi sebagai sisi retensi

PDI pada lumen retikulum endoplasma. PDI ragi mengandung dua urutan residu asam amino sebagai sisi aktif, yaitu CGHC, mirip dengan urutan residu asam amino pada sisi aktif thioredoksin, CGPC.

Seperti dalam PDI mamalia, PDI ragi terdiri dari domain- domain yang memiliki urutan residu asam amino yang mirip, seperti domain a / a'. Melalui penjajaran dengan urutan residu asam amino PDI manusia, residu asam amino PDI ragi dikelompokkan dalam lima domain, yaitu a, b, b', a' dan c. Domain b dan b' PDI diduga berperan dalam pengikatan substrat selama proses *folding* protein di dalam sel. Adanya beberapa domain ini, menerangkan bahwa PDI ragi memiliki beberapa fungsi di dalam sel.

Mutasi terhadap gen *PDII* ragi telah dilakukan untuk mengetahui fungsi PDI secara *in vivo*. Delesi seluruh gen *PDII*, mengakibatkan ragi menjadi letal, gejala ini menunjukkan bahwa PDI ragi dikode oleh gen yang sangat penting bagi viabilitas ragi (Farquhar, *et al.*, 1991). Mutasi pada kedua sisi aktif, yaitu CGHC diubah menjadi CLHS pada sisi pertama dan CIHS pada sisi kedua, menyebabkan penurunan aktivitas katalitik PDI secara *in vitro*. Ragi yang mengalami mutasi ini masih dapat tumbuh, tetapi kemampuannya dalam membentuk ikatan disulfida dalam *folding* protein menurun. Fungsi PDI dalam viabilitas sel lebih terkait dengan kemampuannya dalam mengikat substrat polipeptida yang melipat di retikulum endoplasma, dibandingkan dengan fungsinya untuk biokatalis pembentukan ikatan disulfida. Delesi sepertiga ujung C terminal *PDII* (termasuk sinyal retensi), menyebabkan PDI dapat disekresi dari retikulum endoplasma, dan raginya masih dapat tumbuh dengan baik. Penghilangan PDI dari ragi berakibat menurunnya laju transpor dan pematangan karboksipeptidase Y (protein yang memiliki 5 ikatan disulfida) keluar dari retikulum endoplasma. Walaupun sel ragi mati,



tetapi hal ini menunjukkan bahwa PDI berperan dalam mengendalikan laju transpor protein. Hambatan transpor karboksipeptidase Y (CPY) ini dapat ditekan oleh adanya *over* ekspresi protein Eug 1 p, yaitu protein di mana sistein `posisi ke-2 dari kedua sisi aktif PDI dimutasi (Tachibana, 1992).

### BAB III

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Tujuan Penelitian

Penelitian tahun pertama ini bertujuan :

1. Mengamplifikasi gen protein disulfida isomerase dengan PCR dan menentukan ukuran gen hasil PCR tersebut.
2. Mendapatkan rekombinan pGem-T-PDII dari penyambungan gen PDII dengan vektor pGemT dalam klon *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ .

### 3.2. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam mempelajari struktur gen dan biokimia enzim protein disulfida isomerase, sehingga berguna bagi pengembangan ilmu pengetahuan. Selain itu, hasil penelitian ini diharapkan pula dapat digunakan sebagai acuan untuk pengembangan produksi enzim PDI terutama berkaitan dengan peningkatan produktivitasnya, sehingga dapat memenuhi kebutuhan enzim PDI di banyak industri.





## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Sampel Penelitian

Sampel penelitian berupa biakan *Escherichia coli* yang mengandung pRS314-PDII diperoleh dari Laboratorium protein-enzim, Departemen Kimia, FMIPA-ITB Bandung.

#### 4.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : yeast ekstrak, bacto trypton, ampisilin, NaCl, agarosa, tris base, HCL, etidium bromida, MgSO<sub>4</sub>, film Polaroid, dNTP, ddH<sub>2</sub>O, bufer PCR, DNA polimerase, primer *forward* dan *reverse*, pGem T *vector kit*, CaCl<sub>2</sub>, *Bgl* II, *Nde* I, *Hind* III, *Bam* HI, *Hpa* I, *Eco* RV, *Sal* I, DNA  $\lambda$ , tips pipet dan *eppendorf tube*.

Adapun peralatan yang digunakan terdiri dari *incubator*, *shaker*, *autoclave*, sentrifuga, spektrofotometer UV-Vis, neraca, laminar, tabung reaksi, mikropipet, freezer, PCR *Gene Cycler*<sup>TM</sup> (*Bio Rad*) dan peralatan elektroforesis.

#### 4.3. Cara Kerja

##### 4.3.1. Peremajaan *Escherichia coli*

Koloni tunggal *E. coli* diambil dengan jarum ose dan digoreskan dalam media LB padat (bacto tripton 1 % (b/v), ekstrak ragi 0.5 % (b/v), NaCl 1% (b/v), dan bacto agar 2 % (b/v)) yang mengandung ampisilin 100  $\mu$ g/mL secara aseptis, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam.

#### 4.3.2. Isolasi DNA plasmid Skala Kecil

DNA plasmid diisolasi dalam skala kecil menurut metode Sambrook *et al.*, (1989). Sebuah koloni tunggal *E. coli* ditumbuhkan dalam 10 mL media LB cair (bakteri tripton 1 % (b/v), ekstrak ragi 0.5 % (b/v), dan NaCl 1% (b/v)) yang mengandung ampisilin 100 µg/mL, dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan laju pengocokan 150 rpm selama 12-16 jam. Sebanyak 1-1.5 mL dari kultur *E. coli* dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf*, dan disentrifugasi dengan laju putaran 10.000 rpm, suhu 4 °C, selama 5 menit. Pelet sel disuspensikan dengan 100 µL larutan I dingin [glukosa 50 mM, bufer Tris-Cl 2.5 mM (pH 8), Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM], kemudian divorteks hingga homogen dan didiamkan selama 5 menit. Suspensi yang terbentuk ditambah 200 µL larutan II ( NaOH 0,2 N dan SDS 1 %) segar, dan dihomogenkan dengan cara membolak-balikkan tabung, lalu diinkubasi dalam es selama 15 menit. Suspensi selanjutnya ditambah 150 µL larutan III dingin ( 6 mL CH<sub>3</sub>COOK 5M, 11,5 mL asam asetat glasial dan 28,5 mL H<sub>2</sub>O), dikocok dengan vorteks selama 5 menit dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Campuran disentrifugasi dengan laju putaran 12.000 rpm suhu 4 °C selama 15 menit. Selanjutnya supernatan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* baru, ditambah etanol absolut sebanyak 2 kali volume, didiamkan pada suhu kamar selama 2 menit dan disentrifugasi lagi pada kondisi sama. Pelet DNA dicuci dengan 200 µL etanol 70 %, disentrifugasi lagi dengan kondisi sama, lalu dikeringkan. Terakhir pelet DNA dilarutkan dalam 25 µL bufer TE pH 8 atau ddH<sub>2</sub>O dan disimpan pada suhu -20 °C.

#### 4.3.3 Amplifikasi Gen *PDII* Ragi Menggunakan PCR

Gen *PDII* ragi diamplifikasi menggunakan PCR. Campuran reaksi PCR terdiri dari : 10  $\mu$ L bufer PCR 10X (KCl 50mM, bufer Tris HCL 10 mM, pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatin 0.01 % (b/v)), campuran dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 10 mM, primer *forward* FD1 dan primer *reverse* RD2 masing-masing 50 pmol, DNA template pRS314-*PDII* 600 ng, enzim *Taq DNA polymerase* 1 unit dan ddH<sub>2</sub>O sampai volume 100  $\mu$ L. Proses PCR dilakukan menggunakan alat *Gene Cyclor* dengan kondisi denaturasi 94 °C, 1 menit; penempelan primer (*annealing*) 49 °C, 1 menit; dan polimerisasi 72 °C, 2 menit sebanyak 25 siklus. Proses ini disempurnakan dengan kondisi pre denaturasi 94 °C, 4 menit dan *extention* 72 °C selama 5 menit. Hasil PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

#### 4.3.4 Isolasi Fragmen DNA dari Gel Agarosa

Fragmen DNA dari gel agarosa diisolasi dengan *GFX purification kit*. Amplikon hasil PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1 % dalam larutan bufer TAE 1X. Fragmen DNA yang dihasilkan divisualisasi dengan sinar UV. Pita pada gel yang menunjukkan fragmen DNA yang diinginkan dipotong dengan *cutter* steril. Potongan gel agarosa dilarutkan dalam bufer *capture* (campuran asam asetat dan *chaotropic agent*), dengan perbandingan setiap 300 mg gel memerlukan 300  $\mu$ L bufer *capture*. Pelarutan dibantu dengan pengocokan menggunakan vorteks selama 5 menit dan inkubasi pada suhu 60 °C sampai semua gel agarose larut sempurna. Sebanyak 600  $\mu$ L larutan DNA yang mengandung agarosa ini dimasukkan ke dalam kolom GFX yang berisi matriks *fiber glass*, lalu disentrifugasi pada laju putaran 10.000 rpm, suhu 4°C, selama 1 menit. Selanjutnya matrik kolom dicuci dengan bufer pencuci (campuran bufer Tris Cl pH 8,

EDTA 1mM dan etanol absolut) dan disentrifugasi ulang pada kondisi yang sama. Fragmen DNA yang terikat pada matrik dielusi dengan penambahan ddH<sub>2</sub>O sebanyak volume tertentu, yang disesuaikan dengan konsentrasi DNA yang diinginkan, didiamkan selama 5 menit, disentrifugasi pada laju putaran 10.000 rpm, suhu 4°C selama 5 menit, dan disimpan pada suhu - 20 °C.

#### 4.3.5 Elektroforesis Gel Agarosa Fragmen DNA

Fragmen DNA dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa. Agarosa 1 % [0,4 gram agarosa dalam 40 mL bufer TAE 1x (Tris-asetat 0,04 M; Na<sub>2</sub>EDTA 0,001 M, pH 8)] dipanaskan hingga mendidih, kemudian didinginkan hingga 40-50 °C, lalu dituang pada cetakan gel dan dibiarkan memadat. Gel agarosa diletakkan dalam alat elektroforesis dan direndam dengan bufer TAE 1x.

Sampel DNA dicampur dengan *loading* bufer [bromofenol biru 0,25% (b/v); sukrosa 40% (b/v)] menurut perbandingan 5 : 1, lalu ditambah ddH<sub>2</sub>O sehingga dapat mencapai volume 12-20 µL. Campuran ini dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa, lalu dielektroforesis dalam medan listrik 70 volt sampai warna biru bromfenol biru bermigrasi mendekati batas akhir gel. Gel direndam dalam larutan etidium bromida 0.5 µg/mL selama 1-5 menit, lalu direndam dalam MgSO<sub>4</sub> 10 mM selama 15 menit. Pita-pita DNA diamati dengan sinar UV dan didokumentasi dengan kamera *polaroid*.

#### 4.3.6 Ligasi gen *PDII* dengan Vektor pGem T

Reaksi ligasi antara gen *PDII* dengan vektor pGem T dilakukan menurut rancangan pada tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Reaksi ligasi gen *PDII* dengan vektor pGem T**

Bahan	Reaksi ligasi	Kontrol ligasi	Kontrol dasar
pGem T (50ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
Gen <i>PDII</i> hasil PCR (60 ng/ $\mu$ L)	3 $\mu$ L	-	-
DNA sisipan (kontrol)	-	2 $\mu$ L	-
Bufer 10 X T4 DNA ligase	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
<i>T4 DNA ligase</i> (1 unit)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O sampai volume	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

Reaksi dilakukan dalam tabung mikrosentrifuge 0.5 mL, dihomogenkan dengan pipet mikro, lalu diinkubasi pada suhu 4 °C selama semalam.

#### 4.3.7. Transformasi *E. coli* dengan DNA Plasmid

Transformasi *E. coli* dilakukan menurut metode kalsium klorida (Sambrook et al., 1989). Koloni tunggal *E coli* DH 5 $\alpha$  ditumbuhkan dalam 10 mL media LB cair dengan laju pengocokan 150 rpm, suhu 37 °C selama 16 jam. Kultur sel sebanyak 1 mL di remajakan dalam 50 mL media LB cair dan diinkubasi pada kondisi sama hingga mencapai OD 0,4 – 0,5 (sekitar 2 jam). Kultur sel ditempatkan dalam es selama 10 menit, lalu pelet sel dipisahkan dari supernatan dengan sentrifugasi, suhu 4 °C, laju putaran 12.000 rpm selama 10 menit. Pelet sel dicuci dengan 20 mL larutan CaCl<sub>2</sub> 0,1M dingin, lalu dipisahkan dengan sentrifugasi pada kondisi sama. Pencucian dilakukan sebanyak 2

kali supaya pelet sel bebas dari media. Untuk mendapatkan sel kompeten, pelet sel diresuspensi dengan 2,5 mL larutan  $\text{CaCl}_2$  dingin dan diinkubasi dalam es selama 18 jam.

Transformasi *E. coli* dilakukan dengan cara mencampur 200  $\mu\text{L}$  sel *E. coli* kompeten dengan 100 ng DNA plasmid dalam tabung *Eppendorf* 1,5 mL, diinkubasi dalam es selama 1-4 jam, lalu diberi kejutan panas (*heat shock*) suhu 42 °C selama 2 menit agar DNA plasmid masuk ke dalam sel *E. coli*. Setelah *heat shock*, suspensi sel segera ditempatkan dalam es selama 5 menit, kemudian ditambahkan 800  $\mu\text{L}$  media LB cair dan di inkubasi dengan laju pengocokan 150 rpm, suhu 37 °C selama 1 jam. Suspensi sel selanjutnya disebar pada media LB padat yang mengandung ampisilin 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 jam. Efisiensi transformasi ditentukan dengan cara menghitung banyaknya tranforman *E. coli* yang tumbuh per mg DNA plasmid yang digunakan.

#### 4.3.8. Pemotongan DNA Plasmid dengan Enzim Restriksi

Enzim restriksi yang digunakan untuk memotong DNA plasmid terdiri dari *Eco* RV, *Hpa* I, *Nde* I dan *Bgl* II, *Hind* III, *Sal* I, dan *Bam* HI. Reaksi pemotongan memerlukan bufer yang sesuai untuk jenis enzim restriksi menurut spesifikasi dari produsen enzim.

Sebanyak 0.1 – 1.0  $\mu\text{g}$  DNA plasmid dalam tabung *Eppendorf* 0.5 mL, ditambahkan 2  $\mu\text{L}$  bufer restriksi 10X, dan enzim restriksi dengan aktivitas sebesar 2-5 unit. Campuran ditambah ddH<sub>2</sub>O sampai mencapai volume 20  $\mu\text{L}$ . Campuran reaksi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2-4 jam, dan dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa.

## BAB V

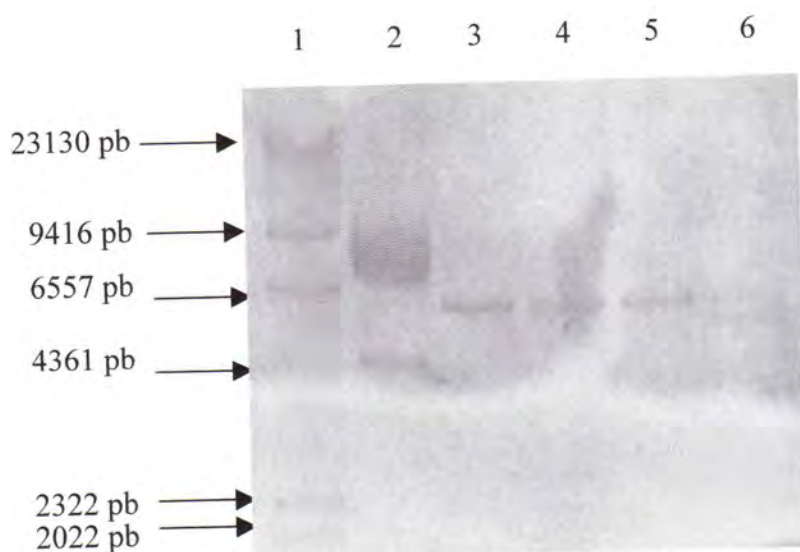
### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Penyiapan Plasmid dan Analisis Restriksi

Plasmid yang digunakan sebagai template dalam amplifikasi gen protein disulfida isomerase ragi adalah pRS314-*PDII*. Plasmid rekombinan ini berasal dari plasmid pRS314 (vektor ekspresi ragi yang berukuran 4.785 pb) dan sisipan gen *PDII* pada sisi restriksi *Bam*HI dan *Eco*RI. Penyiapan DNA plasmid ini bertujuan untuk memperoleh plasmid pRS314-*PDII* dalam jumlah yang mencukupi, sehingga dapat memenuhi untuk keperluan analisis restriksi dan juga sebagai template dalam amplifikasi gen *PDII* dengan PCR. Untuk hal tersebut, telah dilakukan peremajaan *Escherichia coli* [pRS314-*PDII*] dalam media LB padat yang mengandung ampisilin. Dari koloni tunggal *E. coli* yang ditumbuhkan, kemudian dilakukan isolasi DNA plasmid pRS314-*PDII* menggunakan metode lisis alkali dan analisis pemotongan DNA plasmid dengan beberapa enzim restriksi. Hasil isolasi dan analisis restriksi tersebut dapat dilihat pada gambar 5.1.

Dalam gambar 5.1, topologi DNA plasmid pRS314-*PDII* hasil isolasi yang tidak dipotong oleh enzim restriksi tercantum dalam lajur 2. DNA plasmid pRS314-*PDII uncut* ini muncul dengan topologi lebih dari satu pita DNA, akan tetapi molekul-molekul tersebut berukuran sama. Pita-pita DNA tersebut merupakan perpaduan antara bentuk *close circular*, linier dan *open circular* DNA plasmid hasil isolasi. Bentuk-bentuk ini muncul disebabkan oleh terjadinya kerusakan DNA plasmid sebagai akibat adanya pengaruh gaya hidrodinamik pada waktu proses isolasi. Sedangkan topologi DNA plasmid pRS314-*PDII* yang telah dipotong dengan enzim restriksi *Hpa*I, *Hind*III, *Sal*I

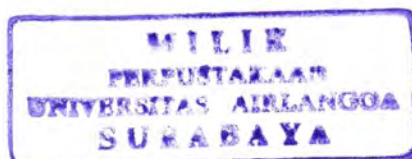
dan *Bgl*II berturut-turut dapat dilihat pada lajur 3, 4, 5, dan 6. Pemotongan DNA plasmid pRS314-*PDII* oleh enzim-enzim tersebut hanya menghasilkan satu pita DNA berukuran  $\pm 6500$  pb, hal ini menunjukkan bahwa enzim-enzim restriksi ini hanya memiliki satu situs pengenalan pada DNA plasmid pRS314-*PDII*.



Gambar 5.1. Hasil analisis restriksi plasmid pRS314-*PDII*. Lajur 1, *Marker* DNA  $\lambda$ /*Hind* III; lajur 2, pRS314-*PDII* *uncut*; lajur 3, pRS314-*PDII*/*Hpa*I; lajur 4, pRS314-*PDII*/*Hind*III; lajur 5, pRS314-*PDII*/*Sal*I; lajur 6, pRS314-*PDII*/*Bgl*II.

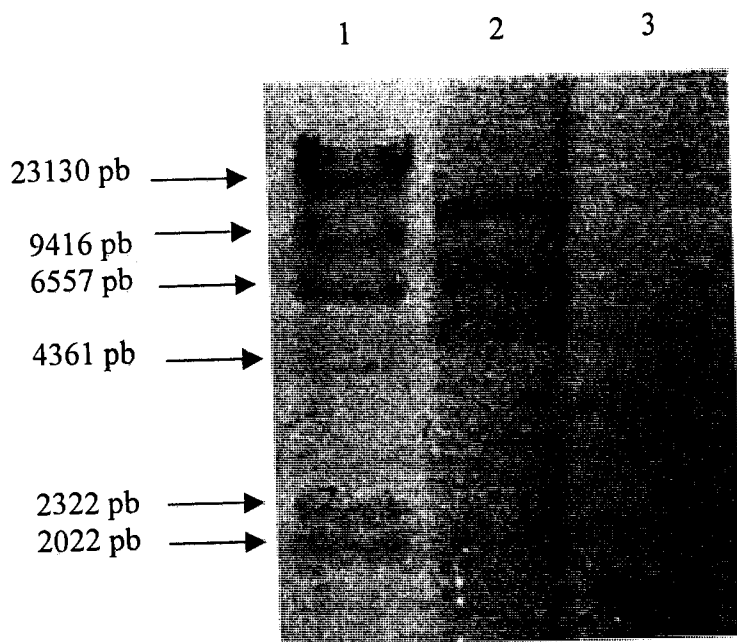
## 5.2. Hasil Amplifikasi gen *PDII* menggunakan PCR

Gen *PDII* pada template pRS314-*PDII* diamplifikasi dengan PCR menggunakan dua buah primer, yaitu primer *forward* yang memiliki nukleotida *linker* untuk situs pemotongan oleh enzim restriksi *Nde*I dan primer *reverse* yang memiliki nukleotida *linker* untuk situs pemotongan oleh enzim restriksi *Bam*HI. Urutan nukleotida primer *forward* arah 5'  $\rightarrow$  3' adalah GAGGACATATGAAGTTTTCTGCTGGTG, sedang





primer *reversenya* dalam arah yang sama, yaitu 5' → 3' adalah GAGGAGGATCCTTACAATTCATCGTGAATGG. Pemberian nukleotida *linker* pada primer-primer ini dirancang sebagai strategi dalam mengekspresikan gen *PDII* di *Escherichia coli* pada tahap penelitian berikutnya. Hasil amplifikasi gen *PDII* dengan PCR ini dapat dilihat pada gambar 5.2.

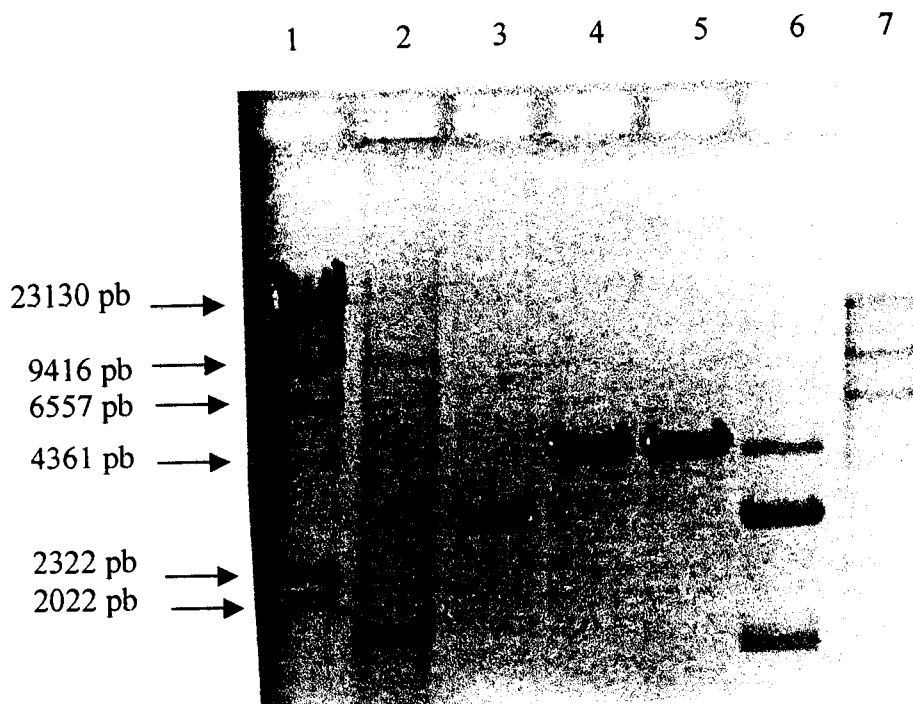


Gambar 5.2. Hasil Amplifikasi gen *PDII* dengan PCR. Lajur 1, *Marker DNA*  $\lambda$ *Hind* III; lajur 2, pRS314-*PDII uncut* untuk kontrol; lajur 3, amplicon gen *PDII*.

Proses amplifikasi dengan PCR ini dapat menghasilkan fragmen DNA berukuran  $\pm 1700$  pb (gambar 5.2, lajur 3). Fragmen DNA tersebut ekuivalen dengan ukuran gen *PDII*. Amplicon ini selanjutnya diisolasi dari gel agarosa dan dimurnikan untuk diinsersikan ke vektor T, suatu vektor hasil PCR, dan juga untuk keperluan karakterisasi lebih lanjut.

### 5.3. Kloning Gen *PDII* di *Escherichia coli* Menggunakan Vektor T

Fragmen DNA gen *PDII* hasil PCR, mempunyai nukleotida A pada ujung 3'. Gen ini diligasi dengan vektor pGem-T, yaitu vektor dengan nukleotida T pada ujung 5', sehingga antar ujung-ujung kedua fragmen DNA tersebut dapat saling komplemen. Ligasi dilakukan dengan enzim T4 DNA ligase. Hasil reaksi ligasi digunakan untuk mentransformasi sel *E. coli* DH 5 $\alpha$  sehingga gen *PDII* tersebut dapat diperbanyak. Untuk menganalisis keberhasilan proses ligasi, maka dilakukan isolasi DNA plasmid rekombinan dan analisis pemotongan pGem T-rekombinan menggunakan enzim restriksi, yang menghasilkan peta restriksi pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Hasil pembentukan rekombinan pGemT-PDII dan analisis restriksinya. Lajur 1 & 7, Marker DNA  $\lambda$ Hind III; lajur 2, Gen *PDII* yang diinsersikan; lajur 3, pGemT uncut/*EcoRV*; lajur 4, rekombinan pGemT-*PDII*/*NdeI*; lajur 5, rekombinan pGemT-*PDII*/*BamHI*; lajur 6, rekombinan pGemT-*PDII*/*NdeI* & *BamHI*.

Vektor pGem T mempunyai ukuran  $\pm 3000$  pb, sedangkan gen *PDII* mempunyai ukuran  $\pm 1700$  pb. Hasil ligasi kedua fragmen DNA tersebut dapat menghasilkan rekombinan pGem T- *PDII* yang berukuran  $\pm 4700$  pb. Pemotongan rekombinan pGem T-*PDII* oleh enzim *Nde* I dan *Bam* HI, menghasilkan satu pita DNA ( $\pm 4700$  pb) (gambar 5.3, lajur 4 & 5). Sedangkan pemotongan ganda pGem T rekombinan dengan enzim *Nde* I dan *Bam* HI, menghasilkan dua fragmen DNA berukuran  $\pm 3000$  pb dan  $\pm 1700$  pb ( gambar 5.3, lajur 6). Fragmen  $\pm 3000$  pb sesuai dengan ukuran pGem T, sedangkan fragmen  $\pm 1700$  pb sesuai dengan ukuran gen *PDII*.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

1. Fragmen DNA gen berukuran  $\pm 1700$  pb yang ekuivalen dengan ukuran gen *PDII* dapat dihasilkan dari amplifikasi gen *PDII* ragi menggunakan PCR.
2. Sebuah fragmen DNA ( $\pm 4700$  pb) hasil pemotongan pGem T rekombinan oleh enzim tunggal, *NdeI*, dan *BamHI*, serta dua fragmen DNA ( $\pm 3000$  pb) dan ( $\pm 1700$  pb) hasil pemotongan oleh dua enzim *NdeI* dan *BamHI*, menunjukkan bahwa gen *PDII* telah terklon di *E. coli*.

#### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penentuan urutan nukleotida gen *PDII* yang telah diamplifikasi dan juga over ekspresi gen tersebut baik di *E. coli* maupun di ragi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anfinsen, C.B., 1973, Principles That Govern the Folding of Protein Chain, **Science**, 181, 223-230.
- Bardwell, J.B. and Beckwith, J., 1993, The Bonds Tie : Catalyzed Disulfide Bond Formation, **Cell**, 74, 769-771.
- Darby, N.J., Straaten, M., Penka, E., Vincentelli, R. and Kemmink, J., 1998, Identifying and Characterizing a Second Structural Domain of Protein Disulfide Isomerase, **FEBS**, 448, 167-172.
- Edman, R.C., Ellis, L., Blacter, R.W., Roth, R.A. and Rutter, W.J., 1985, Sequence of Protein Disulfide Isomerase and Implication of its Relationship to Thioredoxin, **Nature**, 317, 267-270.
- Farquhar, R., Honey, N., Muran, S.J., Bosier, P., Schultz, Montgomery, D., Ellis, R.W., Freedman, R.B. and Tuite, M.F., 1991, Protein Disulfide Isomerase for Viability in *Saccharomyces cerevisiae*, **Gene**, 109, 81-89.
- Freedman, R.B., Hirst, R. and Tuite, M.F., 1994, Protein Disulfide Isomerase Building Bridges in Protein Folding, **Trends in Biochemical Science**, 19, 331-336.
- Klappa, P., Ruddock, L. W., Darby, N. J., and Freedman, R. B., 1998, The b' Domain Provides The Principial Peptide-Binding Site of Protein Disulfide Isomerase but All Domains Contribute to Binding of Misfolded Proteins, **The EMBO journal**, vol 17, pp. 927-935.
- Klappa, P., Koivunen, P., Pirneskoski, A., karvonen, P., Ruddock, L.W., Kivirikko, K.I. and Freedman, R.B., 2000, Mutation That Destabilize the a' Domain of Humain

Protein Disulfide Isomerase Indirectly Affect Peptide Binding, **The Journal of Biological Chemistry**, 275, 18, 13213-13218.

Koivunen, P., Pirneskoski, A., Karvonen, P., Ljung, J., Helaakoski, T., Nothbom, H., and Kiviriko, K. I., 1999, The Acidic C-terminal Domain of Protein Disulfide Isomerase is not Critical for The Enzyme Subunit Function or for The Chaperone or Disulfide Isomerase Activities of The Polypeptide, 1999, **The EMBO journal**, 18, 65-74.

Laboissiere, M.C.A., Sturley, S.L. and Raines, R.T., 1995, the Essential Function of Protein Disulfide Isomerase in to Unscramble Non Native Disulfide Bond, **The Journal of Biological Chemistry**, 270, 28006-28009.

LaMantia, M.L. and Lennarz, W.J., 1993, The Essential Function of Yeast Protein Disulfide Isomerase Does Not Reside in its Isomerase Activity, **Cell**, 74, 899-908.

Mathew, C.K. and Van Holde, K.E., 1996, **Biochemistry**, 2<sup>nd</sup> ed, The Benjamin/Cumming Publisher Co., Menlo Park, 15-21.

Mizunaga, T., Katakura, Y., Miura T. and Mariyana, Y., 1990, Purification and Characterization of Yeast Protein Disulfide Isomerase, **Journal of Biochemistry**, 108, 846-851.

Natalia, D., 1994, Studies on Yeast Protein Disulfide Isomerase, **Thesis**, Department of Biosciences, University of Kent, Canterbury.

Philip, J.T., Bao-he, Q., and Peter, L.P., 1995, Defective Protein Folding ad a Basis of Human Disease, **TIBS**, 20, 456-459.

- Purkan, 2001, Konstruksi dan Karakterisasi Mutan Protein Disulfida Isomerase Ragi yang Tidak Mengandung Domain b', **Tesis**, Departemen Kimia, ITB-Bandung.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, Y., 1989, *Molecular Cloning : A laboratory Press*, New York.
- Tachibana, C. and Steven, T. H., 1992, The Yeast EUG1 Gene Encodes on Endoplasmic Reticulum Protein that is Fuctionally Related to Protein Disulfide Isomerase, **Molecular and Cellular Biology**, **12**, 4601-4611.
- Tachikawa, H., Miura, T., Katalura, Y. and Mizunaga, T., 1991, Molecular Stricter of a Yeast Genes, *PDII* Encoding Protein Disulfide Isomerase That is Essential for Cell Growth, **Journal Biochemistry**, **110**, 306-316.
- Walker, K.W., Lyles, M.M., Gilbert, H.F., 1996, Catalist of Oxidative Protein Folding by Mutant of Protein Disulfide Isomerase as a Foldase, **Buletin of the Philippine Society for Biochemistry and Molecular Biology**, **16**, C14.
- Wang, C.C., 1997, Isomerase and Chaperon Activities are Both Required for Function of Protein Disulfide Isomerase with a Single Active Site Cysteine, **Biochemistry**, **35**, 1972-1980.

PAMERAN

-1 MAY 2005

MILIE  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA