Optimasi Aktivitas Tyrosin Kinase Hasil Isolasi dari Spermatozoa Sapi Perah Frisian Holstein (FH)

The Optimation of Tyrosine Kinase Activity from Sperm Isolation of Friesian Holstein Cow

Sri Pantja Madyawati dan Pudji Srianto

Bagian Reproduksi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Mulyorejo Surabaya 60115, Telp. (031) 5992785; Fax.(031)5993015,
email : spantja@unair.ac.id

Abstract

The research purpose was to determine the optimation of tyrosine kinase activity from sperm isolation of FH cow according to pH, temperature and optimum incubation time. Fresh semen as samples were collected using artificial vagina. Tyrosin kinase was isolated by means of centrifugation and ultrasonication. Activity unit of cow sperm tyrosine kinase is the amount of fosfat µmol of transferred ATP by each mililiter tyrosine kinase enzyme per minute in optimum condition. The optimation of tyrosine kinase activity of sperm according to optimum condition included different pH (6, 6.5, 7, 7.5, 8), temperature (20, 25, 30, 35, 40) ^{o}C and incubation time (20, 25, 30, 35, 40) minute activity was optimum. The result of this research showed that the optimum activity tyrosine kinase of sperm at pH 7, temperature 35 ^{o}C and 30 minutes incubation time with 0,0219 unit activity.

Key words: Tyrosine kinase, tyrosine kinase activity

Pendahuluan

Dalam meningkatkan reproduktivitas ternak sapi perah telah dilakukan berbagai upaya, salah satunya adalah teknologi inseminasi buatan. Dengan teknik inseminasi buatan akan dapat memperbaiki mutu genetik ternak sapi perah dengan cara membuat semen beku yang berasal dari pejantan unggul, hal ini merupakan salah satu cara meningkatkan efisiensi reproduksi (Hafez, 2000).

Pada teknik pembekuan semen masih terdapat kendala yaitu penurunan motilitas spermatozoa *pasca thawing* sebesar 40% (Tanaka dkk., 2000) Perbedaan kondisi temperatur pada saat pembekuan dan *pasca thawing* akan menyebabkan peningkatan permeabilitas membran spermatozoa sehingga menyebabkan kematian sel (Suprayogi, 1996). Hasil penelitian Park dan Graham (1992) menyatakan bahwa kerusakan membran plasma spermatozoa terjadi selama proses pembekuan dan *thawing*. Selanjutnya Pommer *et al.* (2003) mengatakan bahwa spermatozoa yang dibekukan akan menyebabkan perubahan beberapa karakteristik pada membran plasma, antara lain terjadi reorganisasi membran, kadar kalsium meningkat, *reactive oxygen species* (ROS) meningkat dan kemampuan spermatozoa untuk membuahi menurun. Kerusakan integritas membran sel akan mempengaruhi fungsi komponen membran sel spermatozoa yang terdiri dari 43% lipid, 48% protein dan 9% karbohidrat (Park dan Graham, 1992). Menurut Morales dan Lianos (1996), protein tyrosin kinase merupakan salah satu molekul protein yang terdapat pada membran plasma spermatozoa dan berfungsi untuk pengenalan dengan ZP3 serta berperan dalam signal transduksi yang akan menghasilkan autofosforilasi.

Tyrosin kinase merupakan enzim yang mengatur hubungan antar sel, diferensiasi, adhesi serta pergerakan sel. Aktivitas tyrosin kinase sangat dipengaruhi oleh pH, temperatur dan waktu inkubasi (Tesarik *et al.*, 1993). Aktivitas tirosin kinase penting dalam proses autofosforilasi spermatozoa dan aktivitasnya akan maksimum apabila bekerja pada kondisi optimum.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum aktivitas tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah berdasarkan pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum.

Metode Penelitian

Sampel penelitian ini adalah sejumlah semen segar sapi perah yang ditampung dalam tabung reaksi menggunakan vagina buatan sapi untuk isolasi tyrosin kinase spermatozoa, selanjutnya dilakukan

This document was created using SOLID CONVERTER PDF
To remove this message, purchase the product at www.SolidPDF.com

pemeriksaan makroskopis (volume, warna, konsistensi dan pH) dan mikroskopis (motilitas, gerakan massa dan persentase spermatozoa hidup). Untuk memisahkan pellet (spermatozoa dari plasma semen dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 10 menit. Kemudian pellet ditambah dengan media BO-cafein 1 ml, disentrifugasi dengan kecepatan 3 000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan ditambah dengan PBS-tween 5 X volume, ditambah *Phenylmethenesulfonyl fluoride* (PMSF, Promega Corporation, USA) sebagai inhibitor enzim protease sebanyak 5 kali volume, selanjutnya di-vortex selama 10 menit, dilanjutkan dengan sonikasi selama 20 menit. Sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Endapan dibuang, supernatan ditambah dengan etanol dingin 1 : 1, disimpan dalam refrigerator selama 1 jam sampai terbentuk bintik-bintik putih, sentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, dimasukkan ke refrigerator lagi selama 5 menit, Kemudian etanol dibuang dengan menggunakan tissue dan dibiarkan sampai bau etanol hilang. Selanjutnya ditambah dengan Tris-Cl (Art, 822184, Merck-Schuchardt Munchen) Hasil akhirnya adalah isolat *crude* protein dari membran plasma spermatozoa (Aulanni'am, 2004).

Optimasi aktivitas tyrosin kinase spermatozoa dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum dan Pembuatan Kurva Baku ATP

ATP sebanyak 0,0125 g dilarutkan dengan akuades dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml. Selanjutnya diencerkan dengan akuades sampai tanda batas. Larutan ini merupakan larutan stock ATP dengan konsentrasi 125 ppm. Kemudian diambil dengan pipet mikro 2, 4, 6, 8, 10 dan 12 ml larutan stock ATP 125 ppm dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml. Diencerkan dengan akuades sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi ATP 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan mengukur absorbansi dari larutan ATP 50 ppm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang antara 250 – 350 nm, sedangkan pembuatan kurva baku ATP diukur absorbansi dari larutan standar ATP 10, 20, 30, 40, 50, dan 60 ppm pada panjang gelombang maksimum. Selanjutnya persamaan regresi dan kurva baku ATP antara absorbansi versus konsentrasi ATP.

Uji Aktivitas Ekstrak Kasar Tyrosin Kinase

Sebanyak 400 µl isolat tyrosin kinase ditambahkan ke dalam 400 µl larutan ATP 125 ppm dalam bufer asetat pH 6,8. selanjutnya ditambahkan 400 µl Histon 75 ppm lalu diinkubasi pada temperatur 37 ºC selama 30 menit (Matsuo, 1985). Langkah berikutnya ditambahkan 400 µl larutan TCA 8% ke dalam larutan diatas lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang antara 260 nm. Larutan blanko dibuat dengan cara yang sama tetapi tidak ditambahkan larutan ATP. Aktivitas tyrosin kinase ditentukan dengan mengkonversikan nilai absorbansi ATP yang tidak bereaksi (sisa) menjadi konsentrasi ATP yang tidak bereaksi atau sisa (ppm) dengan menggunakan persamaan kurva baku ATP. Konsentrasi ATP yang bereaksi ditentukan dengan menghitung selisih antara konsentrasi ATP awal dengan konsentrasi ATP sisa. Kemudian unit aktivitas tyrosin kinase dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Unit Aktivitas} = \frac{[ATP_{awal} - ATP_{sisa}]}{BM \quad ATP} x \frac{v}{p.q} xfp$$

Penentuan Kondisi Optimum Enzim Tyrosin Kinase

Penentuan pH Optimum dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tyrosin kinase dengan variasi pH yaitu 6,0 , 6,4 , 6,8 , 7,2, 7,4 dan diinkubasi pada temperatur 37ºC selama 30 menit. Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara tyrosin kinase terhadap variasi pH. Aktivitas maksimum menunjukkan harga pH optimum.

Penentuan Temperatur Optimum, dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tyrosin kinase dengan variasi suhu yaitu 30, 32, 35, 38 dan 40 (ºC) dan diinkubasi selama 30 menit. Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tyrosin kinase terhadap variasi suhu. Aktivitas maksimum menunjukkan harga suhu optimum.

Penentuan Waktu Inkubasi Optimum, dilakukan dengan cara menguji aktivitas enzim tyrosin kinase pada pH dan suhu optimum dengan variasi waktu inkubasi yaitu 15, 30, 60, 90 dan 120 menit. Data yang diperoleh ditabulasi dan dibuat grafik antara aktivitas tyrosin kinase terhadap variasi waktu inkubasi. Aktivitas maksimum menunjukkan harga waktu inkubasi optimum.

Hasil dan Pembahasan

Optimasi aktivitas tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah berdasarkan pengaruh pH, temperatur dan waktu inkubasi optimum. Salah satu kondisi optimum yang sangat menentukan karakteristik enzim adalah pH, yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada tabel 1 menunjukkan bahwa pada variasi pH 6, 6,5 dan 8 tidak menunjukkan perbedaan nyata ($p>0,05$), sedangkan pH 7 dan 7,5 menunjukkan perbedaan nyata ($p<0,05$) dengan pH 6, 6,5 dan 8. Aktivitas optimum tyrosin kinase terlihat pada pH 7 yaitu sebesar 0,0208 unit.

This document was created using SOLID CONVERTER PDF
To remove this message, purchase the product at www.SolidPDF.com

Tabel 1. Pengaruh pH terhadap Aktivitas Tyrosin Kinase

pH	Rataan Aktivitas Tyrosin Kinase (µmol/mL/menit)
6	$1,62 .10^{-2a)}$
6,5	$1,69 . 10^{-2a)}$
7	$2,08 .10^{-2c)}$
7,5	$1,94 . 10^{-2b)}$
8	$1,64 . 10^{-2a)}$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (p< 0,05)

Menurut Winarno (1986), keaktifan enzim akibat perubahan pH lingkungan disebabkan oleh terjadinya perubahan ionisasi enzim, substrat atau kompleks enzim- substrat. pH optimum merupakan pH dimana enzim dan substrat berada pada tingkat ionisasi yang diinginkan yaitu gugus pemberi dan penerima proton pada sisi aktif enzim dan substrat sesuai. Pada sisi aktif enzim tyrosin kinase terjadi pelepasan proton pada gugus tiol (SH) sehingga atom S bersifat nukleofil dan akan berikatan dengan gugus fosfat pada substrat. Pada pH 7 terjadi pelepasan proton lebih banyak untuk menyeimbangkan banyak ion OH^- dilingkungannya, sehingga aktivitas enzim untuk mengikat fosfat menjadi maksimum.

Pengujian pengaruh temperatur terhadap aktivitas tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah dilakukan pada variasi temperatur 20, 25, 30, 35 dan 40°C. Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2 .

Tabel 2. Pengaruh Temperatur terhadap Aktivitas Tyrosin Kinase

Temperatur (°C)	Rataan Aktivitas Tyrosin Kinase (µmol/mL/menit)
20	$1,46.10^{-2a)}$
25	$1,71.10^{-2b)}$
30	$1,93.10^{-2b)}$
35	$2,18.10^{-2c)}$
40	$1,63.10^{-2a)}$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (p< 0,05)

Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pada temperatur 20°C dan 40°C berdasarkan uji Anova tidak terdapat perbedaan nyata (p>0,05), sedangkan pada temperatur 35°C berbeda nyata (p<0,05) dengan temperatur 20°C, 40°C serta 25°C, 30°C dengan aktivitas tyrosin kinase sebesar 0,218 unit .

Peningkatan aktivitas tyrosin kinase pada temperatur 20°C sampai 35°C akan memperbesar energi kinetik molekul enzim dan substrat yang akan mempercepat gerakan kedua molekul tersebut sehingga frekuensi molekul-molekul enzim dengan substrat semakin besar akibatnya produk yang dihasilkan maksimum. Pada temperatur optimum 35°C hampir seluruh substrat bereaksi dengan enzim menghasilkan produk maksimum dengan aktivitas sebesar 0,0218 unit. Hal ini sesuai dengan pendapat Winarno (1986) bahwa semakin tinggi temperatur, aktivitas enzim akan semakin besar sampai batas tertentu.

Bila temperatur sangat tinggi, energi kinetik molekul enzim menjadi semakin besar sehingga melampaui energi yang dibutuhkan untuk memecah ikatan-ikatan yang mempertahankan enzim pada struktur alaminya atau pada keadaan katalitik aktif. Akibatnya terjadi kerusakan struktur enzim dimana sebagian ikatan yang menjaga struktur enzim putus sehingga molekul enzim akan terbuka. Terbukanya molekul enzim menyebabkan kerusakan sisi aktif enzim sehingga menyebabkan aktivitas enzim berkurang. (Martin *et al.*, 1983). Hal ini dapat dilihat pada aktivitas tyrosin kinase yang menurun pada temperatur 40 °C.

Pengaruh variasi waktu inkubasi terhadap aktivitas tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Aktivitas Tyrosin Kinase

Waktu Inkubasi (menit)	Rataan Aktivitas Tyrosin Kinase (µmol/mL/menit)
20	$1,77.10^{-2a)}$
25	$1,95.10^{-2a)}$
30	$2,19.10^{-2b)}$
35	$2,02.10^{-2b)}$
40	$1,66.10^{-2c)}$

Keterangan: Superskrip yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (p< 0,05)

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada waktu inkubasi 20 dan 40 menit secara statistik tidak menunjukkan perbedaan yang nyata (p>0,05). Waktu inkubasi 30 menit berbeda nyata dengan waktu inkubasi 20 dan 40 menit serta 25 dan 35 menit (p<0,05) dengan aktivitas optimum tyrosin kinase sebesar 0,0219 unit.

Menurut Lehninger (1995), waktu inkubasi adalah waktu yang diperlukan enzim untuk berikatan dengan substrat. Jika waktu inkubasi pendek, aktivitas enzim akan rendah karena waktu untuk berinteraksi antara enzim dengan substrat yang kecil mengakibatkan interaksi tersebut tidak berlangsung secara keseluruhan sehingga produk yang dihasilkan sedikit. Hal ini terlihat pada aktivitas enzim tyrosin kinase yang rendah pada waktu inkubasi 20 dan 40 menit.

This document was created using SOLID CONVERTER PDF
To remove this message, purchase the product at www.SolidPDF.com

Bila waktu inkubasi diperlama, menyebabkan semakin banyak enzim yang berikatan dengan substrat sehingga produk yang dihasilkan akan semakin besar, seperti yang terlihat aktivitas optimum tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah pada waktu inkubasi 30 menit akan tetapi jika waktu inkubasi lebih diperlama lagi, enzim akan jenuh oleh substrat dan produk yang dihasilkan tetap.

Kesimpulan

Hasil penelitian disimpulkan bahwa: 1) Aktivitas tyrosin kinase sangat dipengaruhi oleh kondisi optimum yang meliputi pH, temperatur dan waktu inkubasi; 2) Kondisi optimum tyrosin kinase hasil isolasi spermatozoa sapi perah adalah pada pH 7, temperatur 35^{o}C dan waktu inkubasi 30 menit

Ucapan Terimakasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada laboratorium Biokimia FMIPA Universitas brawijaya Malang beserta para mahasiswa Fakultas MIPA Unibraw yang telah membantu penelitian ini.

Daftar Pustaka

Aulanni'am. 2004. Prinsip dan Teknik Analisis Biomolekul. Cetakan pertama. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Press. Hal: 16–22.

Hafez ESE. 2000. Reproduction in Farm Animals. 7th Edition. Lea & Febiger. Philadelphia.

Lehninger AL. 1990. Dasar-dasar Biokimia. Jilid I. Alih Bahasa: Maggy Thenawijaya. Erlangga. Jakarta. Hal. 9, 235, 237, 241, 255.

Martin DW, Mayes RA, and Rodwell VW. 1983. Biokimia. Review of Biochemistry. Edisi ke-19. Alih Bahasa: A. Dharma dan S.Kurniawan. CV EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. Hal. 62-67, 87-90, 96.

Matsuo M, Huang Ch, and Huang LC. 1985. Modification and identification of glutamate residues at the arginine-recognition site in the catalytic sub unit of adenosin 3'5'-cyclic monophosphate dependent protein kinase of rabbit skeletal muscle. Biochem J. 187: 371-379.

Park JE and Graham JK. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. J. Theriogenology. 38: 2009-222.

Pommer AC, Rutllant J, and Meyers SA. 2003. Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. Biology of Reproduction. 68: 1208-1214.

Suprayogi TW. 1996. Pengaruh waktu penyimpanan bahan pengencer kuning telur sitrat terhadap daya fertilisasi sel mani domba. Lembaga Penelitian. Universitas Airlangga. Surabaya.

Tanaka H, Herliantien, Herwiyanti E, Lubis OP, Buwono, dan Pujianto J. 2002. Reproduksi Klinik. The Aftercare Technical Cooperation for The Strengthening of Artificial Insemination Center Project. Japan International Cooperation Agency. p. 2.

Tesarik J, Moon J, and Mendoza C. 1993. Stimulation of protein tyrosin phosphorylation by a progesterone receptor on surface of human sperm. Endocrinology. 133: 328 – 335.

Winarno. 1986. Enzim Pangan. Cetakan ke-3. Penerbit PT. Gramedia. Pustaka Utama. Jakarta.

This document was created using SOLID CONVERTER PDF
To remove this message, purchase the product at www.SolidPDF.com