

Protease IgA1 *Ureaplasma urealyticum* bukan enzim tipe logam dan zimografik

Felix M. Mesak,*[§] Retno Wahyuningsih**/**

*Departemen Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

**Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

*** Bagian Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia

Abstrak

Ureaplasma urealyticum merupakan organisme komensal terkecil pada traktus urogenital manusia. Mikroba itu berperan penting dan berasosiasi dengan beragam penyakit ibu dan bayi baru lahir. Salah satu faktor penyebab terjadinya penyakit tersebut ialah protease IgA1. Protease IgA1 mampu memecah antibodi mukosa terdepan manusia, IgA1. Enzim tersebut dikelompokkan menjadi beberapa tipe berdasarkan hambatan aktivitasnya oleh berbagai senyawa inhibitor. Penelitian ini menguji inhibisi aktivitas protease IgA1 ureaplasma terhadap inhibitor protease logam, EDTA, dan inhibitor protease serin, PMSF. Ternyata EDTA dengan konsentrasi 0,1, 1,0 dan 10,0 mM, dan PMSF konsentrasi 0,1, 0,5, dan 1,0 mM tidak mampu menghambat aktivitas pemecahan IgA1 oleh protein total sel ureaplasma. Selanjutnya, pengukuran aktivitas proteolisis protease IgA1 dilakukan menggunakan teknik zimografi dengan substrat kasein dan kontrol positif Igase *N. gonorrhoeae*. Namun hasil zimografi menggunakan SDS-PAGE untuk menguji hal di atas tidak memperlihatkan pemecahan frgmen kasein 29 kDa seperti yang diharapkan. Sehingga dapat disimpulkan protease IgA1 ureaplasma bukanlah tipe protease logam dan tidak memiliki sifat zimogram..

Kata kunci: protease IgA1, protease logam, protease serin, , inhibitor protease, kasein, zimogram.

Ureaplasma urealyticum IgA1 protease is neither metallo- nor zymographic-type enzyme

Abstract

*Ureaplasma urealyticum is one of the smallest inhabitants of human urogenital tract. The microbe plays important role in diseases involving mother and her newborn. One of the pathogenic factors is IgA1 protease. The enzyme cleaves human first line mucosal antibody, IgA1. Based on its inhibition, the enzyme is grouped into several categories. We inhibited the enzyme activity using inhibitors such as EDTA and PMSF against metallo- and serine-proteases activities, respectively. Neither EDTA at 0.1, 1.0, and 10.0 mM nor PMSF at 0.1, 0.5 and 1.0 mM was able to inhibit the IgA1 cleavage by total ureaplasma protein extract. Subsequently, using casein as enzymatic substrate and Igase purified from *N. gonorrhoeae* as positive control, we tested proteolytic activity of the ureaplasma IgA1 protease. Zymography of the assay on an SDS-PAGE resulted that none of 29 kDa casein fragment was cleaved by the enzyme. The results suggest that ureaplasma IgA1 protease is neither metallo- nor a zymographic-type protease.*

Keywords : metallo-protease, serine-protease, IgA1 protease, IgA1, Igase, protease inhibitor, casein, zymogram

[§] Alamat koresponden : Dr. F.M. Mesak e-mail: fmmesak@yahoo.com

Pendahuluan

Ureaplasma urealyticum atau ureaplasma, termasuk ke dalam golongan mikoplasma, kelas *mollicutes*. Ureaplasma bersifat gram negatif, tak berinding sel, hanya diselaputi oleh membran plasma, nonmotil, mikroaerofilik, membutuhkan sterol, suhu optimum pertumbuhan 37°C, dan pH pertumbuhan optimum 6,0. *Ureaplasma* terdapat di dalam saluran urogenital dan saluran respirasi manusia sebagai komensal.^{1,2} *Ureaplasma* dihubungkan dengan infertilitas, prostatitis, varikokel, batu saluran kemih, dan uretritis pada laki-laki dan endometritis pada perempuan. Kuman itu juga mengakibatkan kegagalan konsepsi, janin lahir prematur, berat badan lahir rendah, infeksi akut saluran napas bayi baru lahir dan malahan ditemukan kasus meningitis.³⁻⁷ Kasus klinik tersebut telah diulas lebih mendalam oleh Mesak dan Suhana.⁸

Mesak dan Suhana⁸ mengulas faktor patogenisitas ureaplasma, termasuk diantaranya protease IgA1. Enzim itu merupakan salah satu faktor virulen penting yang mampu memecah daerah *hinge* IgA1 manusia menjadi fragmen-fragmen Fc dan Fab yang berukuran 35 dan 32 kDa.^{9,10} Secara umum, protease IgA1 terbagi menjadi beberapa kelas seperti protease logam dan protease serin.¹¹ Protease logam mengandung sekuen motif His-Glu-Xaa-Xaa-His (HEXXH) yang dengan kristalografi sinar X membentuk situs pengikatan logam, yang biasanya Zn²⁺ dan dihambat oleh EDTA.^{12,13} Sehingga bila protease IgA1 ureaplasma dihambat oleh EDTA, maka enzim itu termasuk protease logam.^{12,13} Senyawa fenil metasulfonil fluorida (PMSF) atau C₇H₇FO₂S merupakan senyawa inhibitor spesifik protease serin dan tiol yang *irreversible*.¹⁴ PMSF mengikat gugus -OH asam amino serin pada situs aktifnya, sehingga situs aktif suatu enzim dapat diketahui.¹⁴ Bila protease IgA1 ureaplasma dihambat oleh PMSF, maka protease IgA1 tersebut termasuk tipe protease serin.^{12,14}

Aktivitas proteolitik protease dapat diukur dengan metode elektroforesis gel poliakrilamida (PAGE) yang telah diinkorporasi dengan substrat ((kopolimerisasi) atau disebut zimogram.^{15,16} Aktivitas degradasi substrat *in situ* akan diketahui setelah renaturasi enzim yang terlihat sebagai pita zona jernih sesuai ukuran enzim protease tersebut. Substrat yang digunakan untuk mengukur aktivitas protease cukup beragam. Salah satunya kasein protein utama susu sapi. Kasein adalah fosfoprotein, dan berada dalam keseimbangan agregat

koloidal kompleks dan terlarut (misel). Kasein dilarutkan dengan dialisis susu skim terhadap buffer fosfat. Pada pH 7,0 komponen kasein terdiri atas kasein α 75%, kasein β 22% , dan kasein γ 3%.¹⁷ Substrat protein seperti kasein bila disisipkan ke dalam gel akan berwarna biru bila divisualisasi dengan biru Coomassie ,sedangkan penanda protein atau profil protein dalam kondisi aslinya (*native*) tidak terlihat.

Dalam penelitian ini dilakukan modifikasi pembuatan zimogram yang sekaligus mampu memperlihatkan ukuran protease yang diinginkan. Selain itu, ingin diketahui apakah protease yang dihasilkan oleh ureaplasma memiliki karakteristik zimogram.

Bahan dan Cara

Asam etilendiamin tetraasetik (EDTA), senyawa pengkelat logam seperti) digunakan untuk mencegah aktivasi enzim karena mudah diperoleh.

Bila ditemukan protease ureaplasma yang mampu memecah kasein, maka dilakukan verifikasi lebih lanjut untuk mengetahui apakah protease tersebut merupakan protease IgA1. Hal itu dapat menjadi substrat alternatif bagi protease IgA1 ureaplasma seperti karakteristik zimogram yang dimiliki oleh Igase *N. gonorrhoeae*.

1. Galur, Kultivasi dan Pemanenan Ureaplasma

U. urealyticum galur DKF3 dan *U. urealyticum* galur CX8 (diperoleh dari R. Hermann, ZMBH, Heidelberg, Jerman). Galur ureaplasma ditumbuhkan pada suhu 37°C menggunakan medium tumbuh cair bromotimol biru dengan modifikasi pemanenan.⁹ Sel yang berasal dari 200 ml kultur cair dipanen pada 10⁷ unit perubahan warna. Kemudian kultur tersebut disentrifugasi pada kecepatan 17.000 rpm, pada suhu 4°C selama 1 jam. Pelet yang diperoleh dibilas dengan sentrifugasi dalam buffer fosfat sebanyak tiga kali. Selanjutnya, pellet disuspensikan dalam 100 μ l buffer fosfat dengan konsentrasi 20 μ g/ μ l total protein sel. Konsentrasi protein sel dihitung menggunakan *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) sesuai petunjuk yang tersedia.⁹ Untuk uji zimogram digunakan 600 μ g total protein sel ureaplasma. Kultivasi, pemeliharaan, pemanenan dan pemeriksaan aktivitas protease IgA1 ureaplasma dilakukan menurut cara Mesak dan Suhana.⁹ Igase murni *Neisseria gonorrhoeae* (diperoleh dari S. C. Beck (*Max-Planck Institut fuer Biologie*, Tuebingen, Jerman) dan IgA1 manusia (Calbiochem).

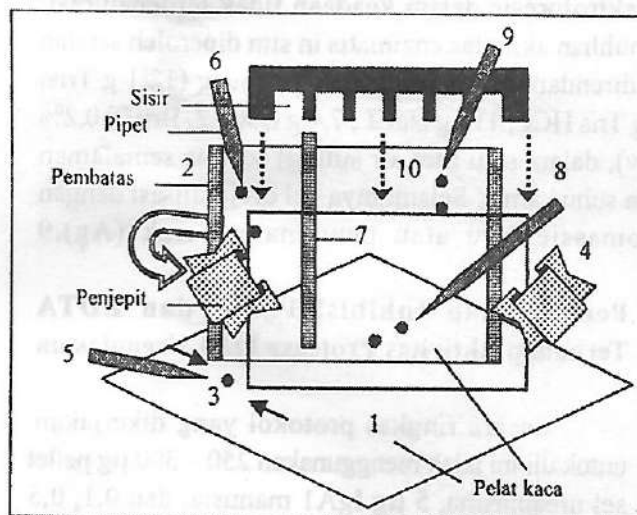
2. Pengukuran Efek Protease Iga1 *Ureaplasma* terhadap Kasein dan Pola Zimografinya memakai SDS PAGE 12%

Efek protease Iga1 *Ureaplasma* terhadap kasein diukur dengan melihat terbentuknya pita bening pada SDS-PAGE.

Prosedur dimulai dengan membuat stok kasein 0,1% yang dilarutkan dalam buffer fosfat (PBS) pH 8,0, dan kemudian pH disesuaikan dengan 1 N HCL, hingga mencapai 7,0 dan 6,0. Selanjutnya sterilisasi dilakukan dengan menggunakan filter 0.45 μ m. Stok kasein dapat disimpan pada suhu -20°C, sebelum digunakan.

Sebanyak 200 μ g protein total sel ureaplasma ditambahkan pada stok kasein (v/v 0.1%). Uji pengaruh waktu dilakukan pada kasein dengan pH 7,0 dan 6,0 dengan waktu inkubasi 1, 3, 6, 16 dan 20 jam. Selain itu diuji juga hasil sonikasi sel ureaplasma baik supernatan maupun pelet terhadap kasein pada kedua pH di atas, masing-masing dalam volume yang sama yaitu 10 μ l. Sebagai kontrol digunakan 1 μ g Igase *N. gonorrhoeae* dan 10 μ l kasein pH 7,0 dan 6,0 dan stok kasein. Sentrifugasi dilakukan sesudah ditambahkan v/v buffer pelisis protein (125 mM Tris-HCL pH 6,8, SDS 4%, β -Merkaptoetanol 10%, gliserol 10%, bromofenol biru 0,02%) kemudian dididihkan selama dua menit. Berbagai konsentrasi protein Setelah SDS-PAGE¹⁹ selesai, visualisasi dilakukan dengan Coomassie biru dan pewarnaan perak (Argentum)¹⁹ Untuk gel pemisah digunakan konsentrasi 12%, sedangkan gel untuk zimogram, dipakai gel tidak didenaturasi dan ditambahkan kasein 0,1% dalam bufer fosfat 0,05 M, pH 8,0. Untuk kondisi gel tidak didenaturasi (*native*), komposisi bufernya sama tetapi tanpa *sodium dodecyl sulfate* (SDS).

Deteksi selanjutnya ialah memanfaatkan teknik zimografi. Oleh karena itu dirancang gel yang sekaligus memiliki bagian dengan penyisipan kasein dan bagian tanpa kasein, (Gambar 1).



Gambar 1. Langkah pembuatan gel untuk zimogram. (1) Semua pelat kaca dibersihkan dengan etanol dan diletakkan tegak lurus terhadap alas. (2) Pembatas gel diatur seperti tampak pada gambar. Pembatas tengah diletakkan sedikit lebih keatas. (3) Kedua pelat kaca penjepit gel dihimpitkan dan (4) Kedua sisinya dijepit kuat-kuat. (5) Beberapa tetes gel pemisah diteteskan pada alas sesuai panjang pelat kaca penjepit gel. Cairan itu akan menyisip keatas secara kapiler mencapai ujung pembatas tengah dan terpolimerisasi. (6) Gel pemisah tanpa kasein dituang hingga setinggi 4/5 bagian dan dianginkan hingga kering. (7) Dengan hati-hati pembatas tengah ditarik keluar. (8) Kemudian dituang lagi gel pemisah dengan kasein hingga ketinggian yang sama dengan (6). Penghilangan gas dilakukan dengan melapisi permukaan atas gel dengan air atau n-butanol. (9) Air atau n-butanol dibuang dengan menyedotnya menggunakan kertas serap atau tisu, lalu dituang gel penahan. (10) Sisir segera disisipkan secara hati-hati dan dibiarkan berpolimerisasi sebelum dicabut kembali sehingga membentuk sumur dalam gel.

Sampel ureaplasma galur DKF3 sejumlah 200, 300, 400, 500, dan 600 μ g dan galur CX8 sejumlah 200, 400, dan 600 μ g didenaturasi dengan penambahan v/v buffer sampel untuk zimogram (2,5 ml Tris-HCL 0,5 M pH 6,8, 2 ml gliserol, 4 ml SDS 10%, 0,5 ml bromofenol biru 0,1%) dalam 10 ml akuades. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 10 menit. Sebagai kontrol positif digunakan protease *Sylvia*²⁰, *Tino*²¹ dan *Daniel*²² untuk menggantikan Igase murni *N. gonorrhoeae* karena jumlahnya sedikit. Gel tanpa SDS untuk zimogram dielektroforesis dengan tegangan 125 Volt dalam bufer elektroforesis dengan kondisi terdenaturasi. Setelah itu gel direndam dalam buffer renaturasi (25% Triton X-100) selama 30 menit pada suhu 37°C, atau dalam keadaan asli/*native* langsung

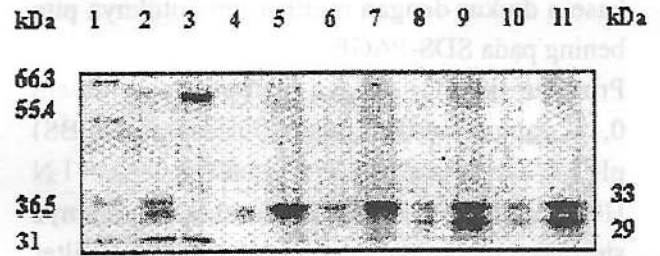
dielektroforesis dalam keadaan tidak terdenaturasi. Pemulihan aktivitas enzimatis in situ diperoleh setelah gel direndam dalam buffer pengembang (12,1 g Tris, 63 g Tris HCL, 117 g NaCL, 7,4 g CaCL₂, Brij35 0,2% (w/v), dalam satu liter air suling) selama semalaman pada suhu kamar. Selanjutnya gel divisualisasi dengan Coomassie biru atau pewarnaan perak (Ag).⁹

3. Pemeriksaan Inhibisi PMSF dan EDTA Terhadap Aktivitas Protease IgA1 Ureaplasma

Secara ringkas protokol yang dikerjakan untuk uji ini ialah menggunakan 250 – 300 µg pellet sel ureaplasma, 5 µg IgA1 manusia, dan 0,1, 0,5 dan 1 mM PMSF atau 0,5, 1,0 dan 10 mM EDTA dalam total volume reaksi 15 µl. Kontrol positif yang digunakan ialah 5 µg IgA1 manusia dan 1 µg Igase dan 300 µg pellet sel ureaplasma. Sebagai kontrol negatif ialah 5 µg IgA1 manusia dalam PBS dan sel protein ureaplasma total. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama semalam. Kemudian sampel dilisis dan dielektroforesis pada SDS-PAGE dan diwarnai menggunakan Coomassie biru.⁹ Selanjutnya, analisis semikuantitatif pita protein hasil elektroforesis menggunakan cara Mesak dan Suhana^{9,10}.

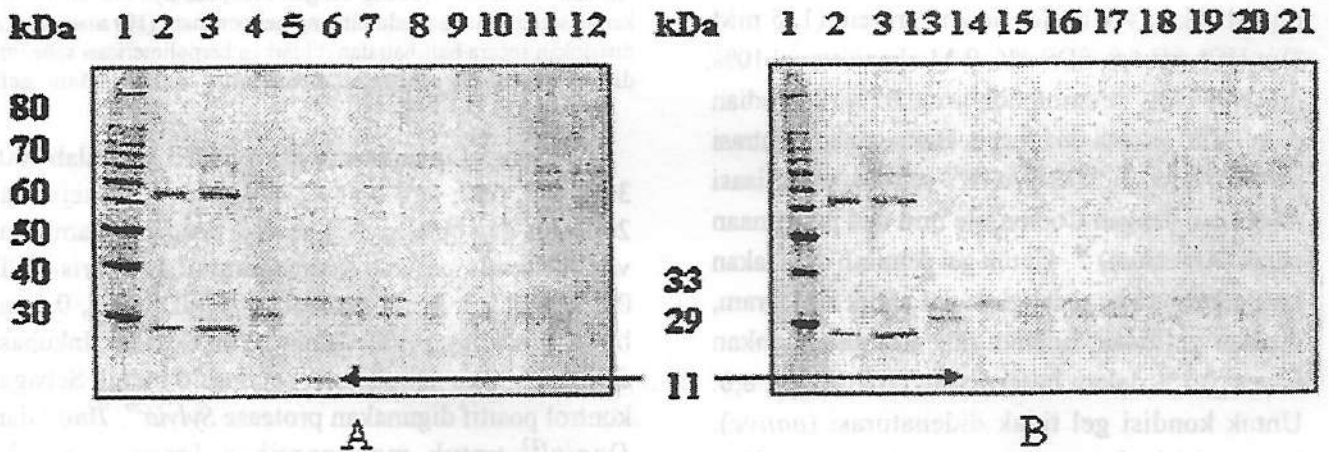
Hasil

Kontrol Igase *N. gonorrhoeae* yang diuji terhadap kasein sebagai substrat ternyata mampu mengeliminasi pita 29 kDa baik pada pH 7,0 maupun pH 6,0 dan menghasilkan pita seberat 11 kDa (Gambar 2).



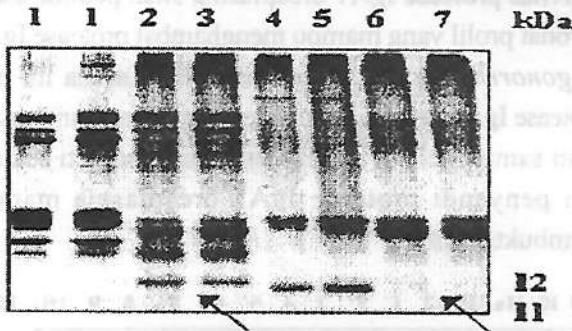
Gambar 2. Igase murni *N. gonorrhoeae* mampu mengeliminasi pita 29 kDa yang merupakan salah satu fragmen kasein. Keterangan: (1) penanda protein Mark 12 (Novex), (2) IgA1 manusia + Igase, (3) IgA1 manusia + buffer PBS, kasein 0,1% (4) pH 6,0 + Igase 1,5 µl, (5) pH 6,0 + Igase 7,0 µl, (6) pH 7,0 + Igase 1,5 µl, (7) pH 7,0 + Igase 7,0 µl, (8) pH 6,0 – 1,5 µl, (9) pH 6,0 – 7,0 µl, (10) pH 7,0 – 1,5 µl, dan (11) pH 7,0 – 7,0 µl.

Sebaliknya, suspensi sel ureaplasma galur DKF3 dengan waktu inkubasi 1, 3, 6, 16, dan 20 jam, baik fraksi terlarut maupun tidak terlarut hasil sonikasi sel tidak memperlihatkan tambahan atau kehilangan pita hasil digesti terhadap kasein baik pada pH 6.0 maupun pH 7.0 seperti control Igase pada pewarnaan menggunakan Coomassie biru (Gambar 3).



Gambar 3. Hasil SDS-PAGE pemeriksaan aktivitas ureaplasma DKF3 terhadap substrat kasein 0,1% pada pH 6,0 (A) dan pH 7,0 (B). Igase memecah pita 29 dan menghasilkan pita 11 kDa Keterangan: (1) penanda protein 10 kDa (Gibco-BRL), (2) IgA1 + buffer PBS, (3) ureaplasma DKF3 + IgA1, (4) kasein 0.1% pH 6,0, (5) kasein pH 6,0 + Igase, ureaplasma _ kasein pH 6,0 (6) 1 jam, (7) 3 jam, (8) 6 jam, (9) 16 jam, (10) 20 jam, (11) supernatan hasil sonikasi + kasein, (12) pelet hasil sonikasi + kasein, (13) kasein 0.1% pH 7,0, (14) kasein pH 7,0 + Igase, ureaplasma + kasein pH 7,0 (15) 1 jam, (16) 3 jam, (17) 6 jam, (18) 16 jam, (19) 20 jam, (20) supernatant + kasein, dan (21) pellet + kasein

Dengan pewarnaan Ag, tampak tambahan pita berukuran 12 kDa pada uji aktivitas protease ureaplasma dengan kasein sebagai substrat pada pH 6,0 dan 7,0. Pita 12 kDa tersebut sama dengan kontrol negatif atau hanya fragmen polipeptida kasein pada kedua nilai pH dengan intensitas berbeda nyata (Gambar 4).



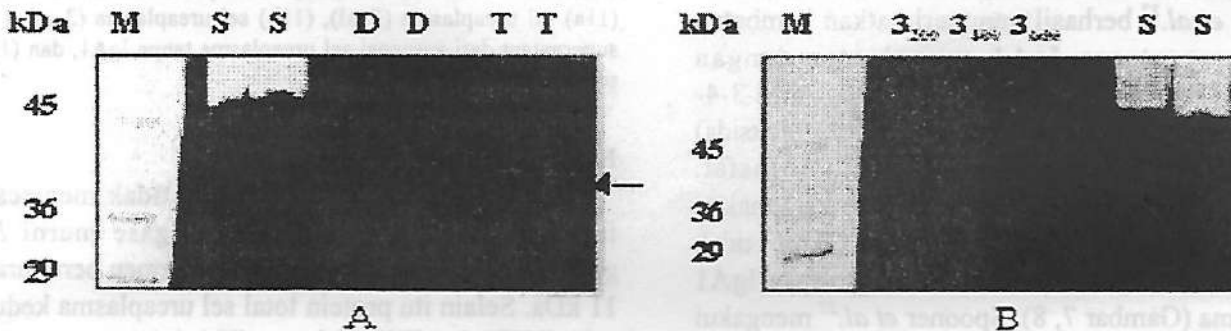
Gambar 4. SDS-PAGE dengan pewarnaan Ag memperlihatkan dua pasang pita yang berukuran sama yaitu 12 kDa namun dengan intensitas warna yang berbeda nyata (tanda panah). **Keterangan:** (1) ureaplasma + IgA1 manusia, (2) Ureaplasma + kasein 0,1% pH 6,0, (3) ureaplasma + kasein 0,1% pH 7,0, (4) kasein 0,1% pH 6,0 + Igase, (5) kasein 0,1% pH 7,0 + Igase, (6) kasein 0,1% pH 6,0, dan (7) kasein 0,1% pH 7,0

Pembuktian lebih lanjut dilakukan dengan menggunakan zimografi. Dengan teknik yang digunakan baik dengan kondisi terdenaturasi (Gambar 5) atau tidak terdenaturasi (Gambar 6), ureaplasma DKF3 dan CX8 dengan konsentrasi total protein sel antara 200 hingga 600 µg tidak memperlihatkan zona jernih hasil digesti kasein pada gel kopolimerisasi seperti kontrol positif protease *Sylvia*²⁰, *Tino*²¹ atau *Daniel*²². Inhibitor protease-serin PMSF dengan konsentrasi 0,1, 0,5 dan 1,0 mM tidak memperlihatkan hambatan terhadap aktivitas protease IgA1 ureaplasma galur

DKF3. Hal yang sama diperlihatkan pula oleh inhibitor protease-logam EDTA dengan konsentrasi 0,5, 1,0, dan 10 mM. Hasil SDS-PAGE tetap memperlihatkan fragmen berukuran 35 dan 32 kDa pada semua perlakuan (Gambar 7). Hasil analisis menggunakan skor¹⁰ terhadap konsentrasi PMSF atau EDTA juga memperlihatkan grafik linier yang sama antara rantai berat, rantai ringan dan dua fragmen hasil digesti parsial rantai berat, Fc dan Fab (Gambar 8). Tampak bahwa dengan konsentrasi PMSF atau EDTA berbeda relatif memberikan skor yang sama, sehingga kecondongan grafik yang dibentuk fragmen Fc atau Fab sama dengan rantai berat atau rantai ringan. Berarti, PMSF hingga konsentrasi 1,0 mM maupun EDTA hingga konsentrasi 10 mM tidak memberikan hambatan atau menginduksi aktivitas protease IgA1 ureaplasma.

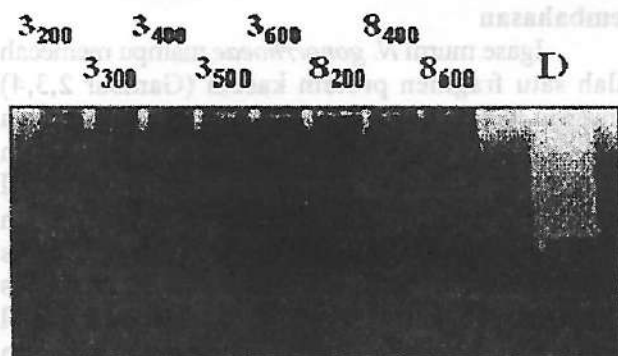
Pembahasan

Igase murni *N. gonorrhoeae* mampu memecah salah satu fragmen protein kasein (Gambar 2,3,4) sehingga kasein dapat menggantikan IgA1 manusia sebagai substrat yang murah. Karena itu, uji pemecahan kasein diterapkan terhadap ureaplasma. Hasil pemeriksaan dengan SDS-PAGE baik visualisasi dengan pewarnaan Coomassie biru maupun Ag yang seratus kali lebih sensitif tidak menunjukkan dengan jelas perubahan pita kasein akibat perlakuan dengan sel ureaplasma (Gambar 3, 4). Verifikasi lebih lanjut dengan zimografi juga tidak memperlihatkan zona jernih hasil degradasi substrat oleh protease ureaplasma (Gambar 5, 6). Berbeda dengan berbagai protease lain yang memiliki karakteristik zimogram,^{23,24} nampaknya protease IgA1 ureaplasma bukan zimogram. Dengan demikian protease lain yang terikat membran plasma juga tidak memiliki aktivitas zimogram.



Gambar 5. Protease kontrol untuk zimogram dengan kondisi terdenaturasi tidak direduksi, *Daniel* (D) dan *Tino* (T) memperlihatkan pita zona jernih (tanda panah) yang berarti enzim mengalami pemulihan aktivitas proteolitiknya terhadap kasein setelah renaturasi (A). Perkecualian terdapat pada protease kontrol *Sylvia* (S) yang masih memperlihatkan aktivitas selama proses elektroforesis (A dan B). Pprotein total sel ureaplasma galur DKF3 (3) sejumlah 200, 400, dan 600 µg tidak memperlihatkan pita zona jernih (B)

Tidak adanya hambatan aktivitas protease IgA1 ureaplasma oleh EDTA 0,5, 1,0, dan 10,0 mM (Gambar 7) memperlihatkan bahwa kofaktor protease ini bukanlah logam (umumnya Zn^{2+}). Berdasarkan hal di atas dapat disimpulkan bahwa gen penyandi protease IgA1 ureaplasma tidak punya sekuen motif pengikatan logam seperti protease IgA1 *Streptococcus pneumoniae*. Protease IgA1 *S. pneumoniae* memiliki sekuen HEMTH pada posisi 1605-1609 dengan 20 sekuen asam glutamat yang sangat konservatif pada ujung karboksil histidin. Motif itu cocok dengan sekuens konsensus pengikatan Zn internal HxxTH.²⁵ Sementara itu protease IgA1 ureaplasma diduga merupakan tipe protease serin karena memiliki kesamaan situs pemotongan IgA1 manusia dengan *N. gonorrhoeae* dan *Haemophilus influenzae* yang mempunyai motif ALGDSGSPLFV.

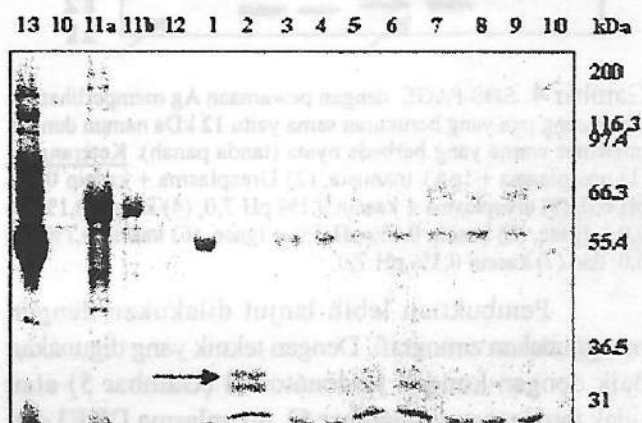


Gambar 6. Zimogram untuk sampel tidak didenaturasi dan tidak direduksi memperlihatkan ureaplasma galur DKF3 (3) dan CX8 (8) tidak membentuk zona jernih degradasi kasein seperti protease kontrol *Daniel* (D). Total protein sel yang dielektroforesis untuk DKF3 ialah 200, 300, 400, 500, dan 600 µg.

Motif tersebut sangat mirip dengan sekuen konservatif disekitar situs aktif serin GDSGGPL pada endopeptidase serin keluarga kimotripsin-tripsin.²⁶ Spooner *et al.*²⁷ berhasil memperlihatkan hambatan aktivitas protease IgA1 ureaplasma dengan menggunakan inhibitor protease serin 0,1 mM 3-4-dikloroiso koumarin dalam DMSO (dimetil sulfoksida) dan 0,1 dan 1,0 mM di-isopropilfluorofosfat.

Sebaliknya penelitian ini dengan menggunakan inhibitor protease serin PMSF^{28,29} hingga 1,0 mM tidak memperlihatkan hambatan aktivitas protease IgA1 ureaplasma (Gambar 7, 8). Spooner *et al.*²⁷ mengakui adanya ketidak seragaman reaksi hambat aktivitas protease IgA1 ureaplasma. Hasil penelitiannya juga memperlihatkan bahwa aktivitas protease IgA1

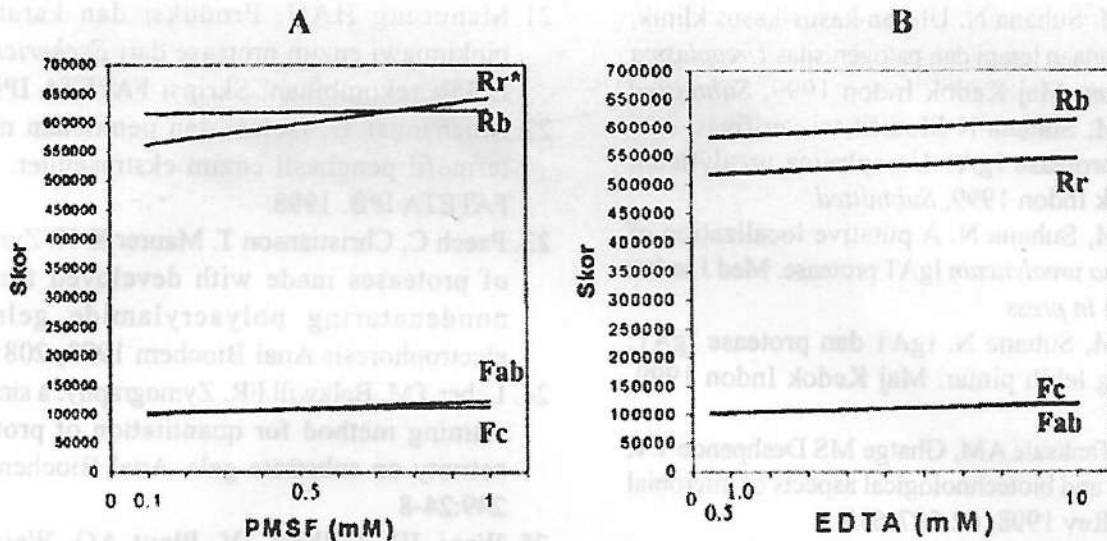
ureaplasma tidak dihambat oleh inhibitor protease serin yang lebih kuat seperti aprotinin, kimostatin dalam DMSO, tosil lisil klorometil keton, tosil fenil alanil klorometil keton dalam methanol, dan leupeptin. Inhibitor protease serin lain yang dapat diuji terhadap aktivitas protease IgA1 ureaplasma ialah peptide asam boronat prolil yang mampu menghambat protease IgA1 *N. gonorrhoeae* dan *H. influenzae*.³⁰ Karena itu tipe protease IgA1 ureaplasma tidak dapat ditentukan dengan pasti sampai telaah molekular lainnya seperti sekuen gen penyandi protease IgA1 ureaplasma mampu membuktikannya.



Gambar 7. Dengan SDS-PAGE tidak terlihat hambatan PMSF dan EDTA terhadap aktivitas protease IgA1 ureaplasma yang ditandai dengan terbentuknya pita 35 dan 32 kDa (tanda panah). Keterangan: (1) IgA1 manusia + buffer PBS, (2) IgA1 manusia + Igase, (3) ureaplasma DKF3 + Igase manusia, (4) DKF3 + 0,1 mM PMSF, (5) DKF3 + 0,5 mM PMSF, (6) DKF3 + 0,1 mM EDTA, (7) DKF3 + 0,5 mM EDTA, (8) DKF3 + 1,0 mM EDTA, (9) DKF3 + 10 mM EDTA, (10) penanda protein Mark12 (Novex), (11a) sel ureaplasma (7 µl), (11b) sel ureaplasma (2 µl), (12) supernatant dari suspensi sel ureaplasma tanpa IgA1, dan (13) serum kuda.

Kesimpulan dan Saran

Protein total sel ureaplasma tidak memecah fragmen 29 kDa kasein seperti Igase murni *N. gonorrhoeae* yang menghasilkan fragmen berukuran 11 kDa. Selain itu protein total sel ureaplasma kedua galur DKF3 dan CX8 tidak memiliki aktivitas zimogram seperti kontrol positif.



Gambar 8 . Skor terhadap fragmen Fc dan Fab memperlihatkan kecondongan grafik linier yang serupa dengan rantai berat (Rb) dan rantai ringan (Rr) IgA1 manusia pada uji aktivitas protease IgA1 dengan penambahan PMSF 0,1, 0,5 dan 1,0 mM (A) dan EDTA 0,5 dan 1,0 lebih tinggi karena mengikuti hasil pewarnaan gel yang memberikan latar belakang lebih gelap sehingga garis linier yang dibentuk lebih condong ke atas dibandingkan lainnya. (Rr*).

Dengan demikian protease IgA1 juga tidak memiliki karakteristik zimogram. Ketidakhampuan inhibitor protease logam EDTA untuk menginaktivasi protease IgA1 ureaplasma menunjukkan bahwa enzim tersebut bukan protease logam dan tidak menggunakan kofaktor logam untuk aktivasinya. Hasil pengujian dengan inhibitor protease serin PMSF, memperlihatkan bahwa protease IgA1 ureaplasma masih tetap mampu memecah IgA1 manusia dan menghasilkan fragmen 35 dan 32 kDa. Penelitian lain, juga memperlihatkan inhibitor protease serin yang mampu dan tidak mampu menghambat aktivitas protease IgA1 ureaplasma. Sehingga diduga protease IgA1 ureaplasma ini mungkin termasuk tipe protease serin. Dugaan semacam ini baru akan terbukti bila dilakukan isolasi dan sekuensing gen penyandi protease IgA1 sehingga dapat ditentukan dengan tepat tipe proteasenya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih yang mendalam kepada Lili Rosana untuk diskusi kritis selama penelitian ini berlangsung. Penelitian merupakan bagian pendidikan S3 FMM yang dibiayai oleh program mahasiswa Unggulan S3 Proyek URGE Batch II (1995/1996-1997/1998). Penelitian di Jerman juga terlaksana atas bantuan MTS, dan DAAD. Penulis juga mengucapkan terima kasih yang tulus atas kebaikan hati R. Herrmann, H.-J. Freisleben

Daftar Pustaka

1. Taylor-Robinson D. Gourlay RN. Genus II. Ureaplasma. In: Krieg NR, Holt JG. Editors. Bergey's manual of systematic bacteriology vo. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins; 1984. p.770-5
2. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. Baltimore: The Williams dan Wilkins; 1994.p. 705-15
3. Taylor-Robinson D. Infection due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* an update. Clin Infec Dis 1996; 23:671-84
4. Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF. The correlation opf *Ureaplasma urealyticum* infection with infertility. Andrologia 1997; 29:219-26
5. Li H, Guo Y, Sun X. Genital *Ureaplasma urealyticum* infection in varicocele-related infertility. Chin Med J 1997; 110:865-8
6. Cassell GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborn. Clin Microbiol Rev 1993; 6:69-87.
7. Abele-Horn M, Peters J, Genzel-Boroviczeny O, Wolff C, Zimmermann A, Gottschling W. Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity. Infection 1997; 25:286-29.

8. Mesak FM, Suhana N. Ulasan kasus-kasus klinik, penatalaksanaan terapi dan patogenisitas *Ureaplasma urealyticum*. Maj Kedok Indon 1999, *Submitted*
9. Mesak FM, Suhana N Modifikasi verifikasi esei aktivitas protease IgA1 *Ureaplasma urealyticum* Maj Kedok Indon 1999, *Submitted*
10. Mesak FM, Suhana N. A putative localization of *Ureaplasma urealyticum* IgA1 protease. Med J Indon 1999; 8(3) *in press*
11. Mesak FM, Suhana N. IgA1 dan protease IgA1: siapa yang lebih pintar. Maj Kedok Indon 1999, *Submitted*
12. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial Mol Biol Rev 1998; 62:597-635
13. Milton DL, Norqvist A, Wolfwatz H. Cloning of metalloprotein gene involved in the virulence mechanisms of *vibro anguillarum*. J Bacteriol 1992; 174:7235-44
14. Palmer T. Understanding enzymes. New York: Ellis Horwood; 1991
15. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of pictogram quantities of gelatinases. Anal Biochem 1994; 218:325-9
16. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. Anal Biochem 1997; 249:24-8
17. Bingham E, Farrell M, Carroll R. Properties of dephosphorylated [[alpha]]sl-casein: precipitation by calcium ions and micelle formation. Biochem 1972; 11:2450
18. Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, Frandsen EVG. Biological significance of IgA1 protease in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. APMIS 1996; 104:321-38
19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-5
20. Kuntjoro S. Karakterisasi biokimiawi enzim protease dari *Bacillus subtilis* DB104 rekombinan. Skripsi FATETA IPB. 1998
21. Manurung HAU. Produksi dan karakterisasi biokimiawi enzim protease dari *Escherichia coli* DH5 α rekombinan. Skripsi FATETA IPB. 1998
22. Moenandar D. Isolasi dan pemilahan mikroba termofil penghasil enzim ekstraseluler. Skripsi FATETA IPB. 1998
23. Paech C, Christianson T, Maurer K-H. Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis Anal Biochem 1993; 208:249-54
24. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. Anal Biochem 1997; 249:24-8
25. Wani JH, Gilbert JV, Plaut AG, Weiser JN. Identification, cloning, and sequencing of the immunoglobulin A1 protease gene of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun 1996; 64:3967-74
26. Plaut AG, Bachovchin WW. IgA1-specific prolyl endopeptidases: serine type. In: Barrett AJ. Editor, Methods in enzymology, Vol. 244: proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. New York: Academic Press; 1994. p 137-51
27. Spooner RK, Russell WC, Thirkell D. Characterization of the immunoglobulin A protease of *Ureaplasma urealyticum*. Infect Immun 1992; 60:2544-46
28. Wu X-C, Lee W, Tran L, Wong S-L. Engineering a *Bacillus subtilis* expression – secretion system with a strain deficient in six extracellular protease. J Bacteriol 1991; 173:4952-58
29. Sloma A, Rufo GA, Theriault KA, Dwyer M, Wilson SW, Pero J. Cloning and characterization of the gene for an additional extracellular serine protease of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 1991; 173:6889-95
30. Bachovchin WW, Plaut AG, Flentke GR, Lynch M, Kettner CA. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. J. Biol Chem 1990; 265:3738-43