



RIJUKAN

LAPORAN AKHIR GERAN INSENTIF

305/PPSP/6110001

Penyediaan graf piawai tisu kallikrein untuk Jabatan Fisiologi

**ASIAH BTE ABU BAKAR
(JTMP)**

Semua laporan kemajuan dan laporan akhir yang dikemukakan kepada Bahagian Penyelidikan dan Pembangunan perlu terlebih dahulu disampaikan untuk penelitian dan perakuan Jawatankuasa Penyelidikan di Pusat Pengajian.

USM JP-06

**BAHAGIAN PENYELIDIKAN
UNIVERSITI SAINS MALAYSIA**

Laporan Akhir Projek Penyelidikan Jangka Pendek

1) **Nama Penyelidik:** ASiah bt. Abu Bakar

Nama Penyelidik-Penyelidik Lain:

(Jika berkaitan)

1. Dr. Mahaneem Mohamed

(Jabatan Fisiologi)

2. Prof. Madya Dr. E.T. Larmie

(Jabatan Fisiologi)

2) **Pusat Pengajian/Pusat/Unit:** Pusat Pengajian Sains Perubatan

3) **Tajuk Projek:** Penyediaan graf Piawai Tisu Kallikrein

untuk Jabatan Fisiologi

(b) Faedah-Faedah Lain Seperti Perkembangan Produk, Prospek Komersialisasi Dan Pendaftaran Paten

(Jika ada dan jika perlu, sila gunakan kertas berasingan)

i) Graf yang diperolehi boleh digunakan untuk kajian akan datang.

ii) Memperolehi kemahiran serta teknik dalam penyediaan piawai yang melibatkan enzim

(c) Latihan Gunatenaga Manusia

i) *Pelajar Siswazah:* _____

ii) *Pelajar Prasiswazah:* Pelajar Prasiswazah iaitu Dr. Mahaneem Mohamed dapat mempelajari kaedah ini dan graf ini digunakan untuk kajian beliau.

iii) *Lain-lain:* _____

KANDUNGAN

1. ABSTRAK
2. PENGENALAN
3. OBJEKTIF
4. PERALATAN DAN KAEDAH
5. KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN
6. KESIMPULAN
7. RUJUKAN
8. LAMPIRAN.

1. ABSTRAK

Substrat chromogenik iaitu H-D-Val-Arg-pNa (S-2266) telah digunakan untuk menyediakan satu graf piawai bagi aktiviti tisu kallikrein. Kadar pembentukan paranitroaniline oleh tisu kallikrein tulen diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 405 nm. Minit ke 4 dipilih sebagai masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein tulen.

Kaedah kinetik memberi garisan yang lebih linear berbanding kaedah titik-akhir. Enzim pada berbagai kepekatan telah digunakan untuk mendapatkan graf piawai tisu kallikrein tulen dan memberi garisan linear $r = 0.999$. Graf ini mempunyai julat kepekatan yang besar iaitu 0 hingga 10U/ml. Ianya boleh digunakan untuk menentukan aktiviti tisu kallikrein di dalam sesuatu tisu atau cecair badan seperti urin pada haiwan dan manusia.

2. PENGENALAN

Tisu kallikrein adalah sejenis enzim 'serine protease' di mana ia berperanan dalam memecahkan kininogen untuk menghasilkan kinin iaitu suatu vasodilator yang poten. Ia boleh didapati pada kebanyakan tisu atau organ seperti pancreas, kelenjar salivari, tisu vaskular, otot jantung, uterus dan plasenta dan juga di dalam cecair badan seperti urin.

Kinin terlibat dalam pelbagai proses fisiologi. Ini termasuklah regulasi tekanan darah, aliran darah setempat, hemostasis sodium, kontraksi dan relaksasi otot licin dan juga merangsang penghasilan mediator lain seperti renin, angiotensin, prostasiklin, prostaglandin E2 dan nitrik oksid. (Campbell DJ, 2001).

Oleh kerana jangkahayat kinin adalah teramat singkat iaitu kurang dari 30saat, pengukuran secara tidak langsung dilakukan iaitu melalui kaedah penentuan aktiviti tisu kallikrein dimana satu graf piawai bagi tisu kallikrein diperlukan. Oleh itu kajian ini adalah bertujuan untuk menyediakan graf piawai tersebut dengan menggunakan tisu kallikrein tulen dan substrat chromogenik, H-D-Val-Arg-pNa (S-2266) yang spesifik kepada tisu kallikrein. Tisu kallikrein menghidrolisis substrat tersebut dan kadar pembentukan paranitroanilin (pNa), dengan menggunakan spektrofotometer, adalah berkadaran dengan aktiviti tisu kallikrein. Masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein serta perbandingan di antara kaedah kinetik dan titik-akhir (end-point) juga dilakukan di dalam penyediaan graf piawai tersebut (Sharma et al 1998).

3. OBJEKTIF

Tujuan kajian ini dijalankan adalah untuk :

- 3.1 Menentukan masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein.
- 3.2 Menyediakan graf piawai tisu kallikrein dan membandingkan kaedah kinetik dan kaedah titik akhir (end point).
- 3.3 Mendapatkan kemahiran dalam penyediaan graf piawai bagi sesuatu enzim.

4. METODOLOGI

4.1 Bahan dan Peralatan

1. Substrat Chromogenik, H-D-Val-Leu-Arg-pNa (S-2266) (Chromogenix Company, Itali)
2. Tisu kallikrein tulen dari pancreas khinzir , 250 U/ml (SIGMA).
3. Tris HCL Buffer pH 9.0, 0.05 M, grade 99.0 % (SIGMA).
4. Air suling steril.
5. 50% asid asetik.
6. Kuvet semimikro (isiupadu 1.5 ml) – Diagnostics Division , USA.
7. Spektrofotometer (jarak gelombang 405nm) – Shidmadzu 160 A.
8. Kukusan air (water bath)
9. Tip pipet dan tabung uji steril.

4.2 Piawaian substrat , pH dan suhu.

Pada setiap tindakbalas dalam penyediaan graf piawai, faktor-faktor seperti kepekatan substrat, pH serta suhu persekitaran ditetapkan. Ini adalah di atas sebab-sebab berikut (Ee LP & Tse AT, 1988):

4.2.1 Substrat.

Enzim adalah protin yang boleh memangkinkan tindakbalas biologi. Kadar tindakbalas sesuatu enzim akan meningkat jika kepekatan substratnya bertambah sehingga suatu kepekatan substrat tidak akan meningkatkan kadar tindak balas. Keadaan ini boleh dikatakan mencapai tahap maksima. Ianya berlaku disebabkan semua tapak enzim dipenuhi oleh substrat. Oleh yang demikian penentuan kepekatan substrat adalah penting bagi sesuatu tindakbalas biologi yang melibatkan enzim.

4.2.2 pH

Kesan pH terhadap aktiviti enzim merupakan suatu kesan yang sangat penting dalam metabolisme. Ini adalah kerana perubahan pH akan mengubah sifat kumpulan amino dan karbosilik di dalam protin yang berada di dalam larutan itu. Biasanya enzim bertindakbalas dengan berkesan pada suatu julat pH yang optimum.

4.2.3 Suhu

Protin sangat peka terhadap haba. Pada suhu 37°C, iaitu pada suhu badan, kadar tindakbalas enzim adalah yang optima. Pada suhu yang tinggi iaitu melebihi 45°C, kadar tindakbalas enzim akan menurun kerana ikatan hidrogen di dalam rantai protin akan pecah dan seterusnya merosakkan konformasi atau strukturnya. Pada suhu yang lebih tinggi iaitu melebihi 65°C proses penyahaslian enzim akan berlaku.

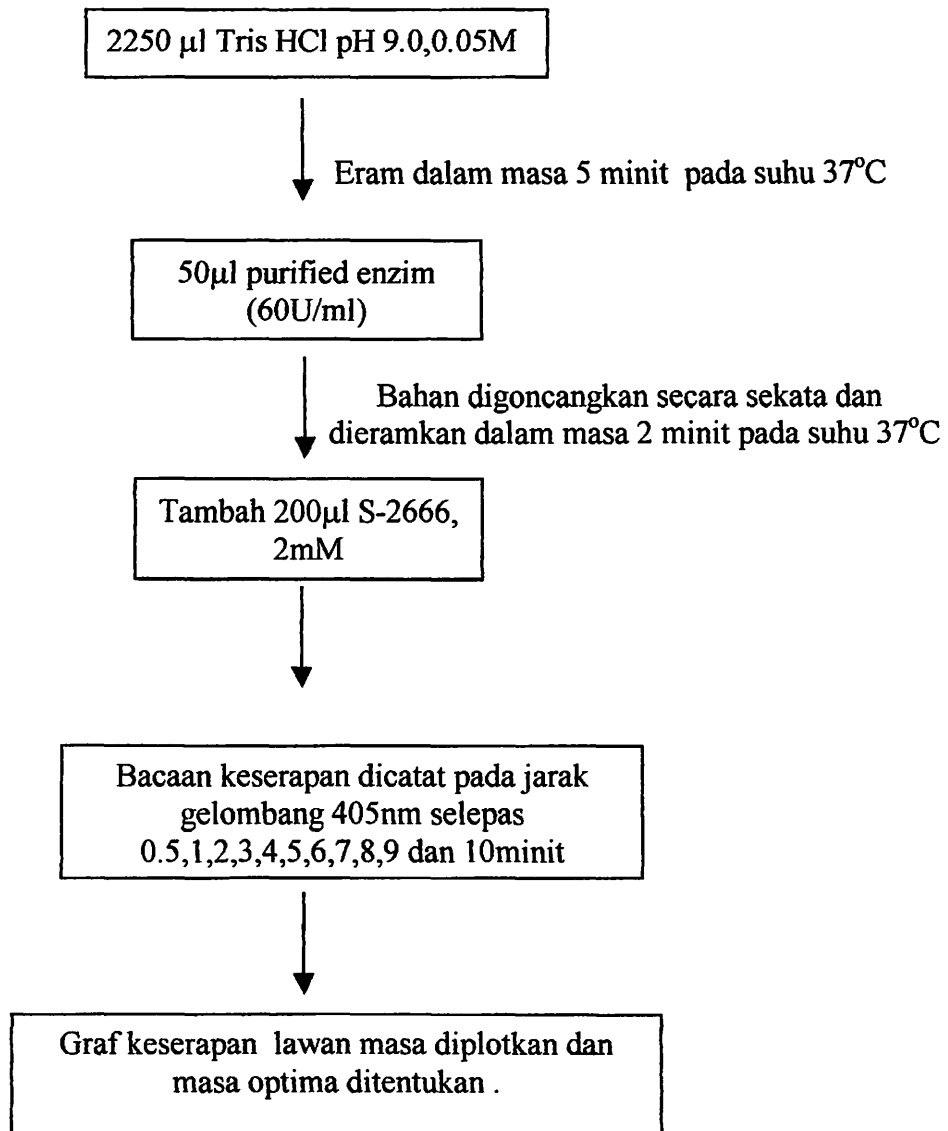
4.3 Penentuan masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein.

Sebelum penyediaan graf piawai dilakukan, masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein, di mana ia menghasilkan graf yang paling linear, ditentukan terlebih dahulu. Ia ditentukan dengan menggunakan 60U/ml tisu kallikrein tulen seperti berikut :-

1. Tabung uji telah dilabel terlebih dahulu.
2. 2250 μ l larutan penampan Tris HCl (pH 9.0, 0.05 M) (Lampiran 1) dimasukkan ke dalam tabung uji . Seterusnya tabung uji ini dieramkan selama 5 minit di dalam kukusan berisi air suling pada suhu 37°C.
3. Kemudian 50 μ l enzim tisu kallikrein tulen berkepekatan 60U/ml (Lampiran 2) dimasukkan ke dalam tabung uji tersebut . Tabung uji ini telah digoncang sekata dan seterusnya dieramkan selama 2 minit pada suhu 37°C.
4. Seterusnya 200 μ l S-2266 berkepekatan 2mmol/L (Lampiran 3) dimasukkan ke dalam tabung uji tersebut. Tabung uji ini sekali lagi digoncang sama rata dan dieramkan pada suhu 37°C.
5. Larutan blank telah disediakan dengan kaedah yang sama kecuali tisu kallikrein tulen diganti dengan larutan 50 μ l Tris HCl.
6. Bacaan keserapan dicatat pada minit ke 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10, dengan menggunakan alat spektrofotometer pada jarak gelombang 405 nm. Langkah-langkah ini diulang sebanyak 3 kali dan nilai purata diambil dari tiga bacaan bagi setiap minit.
7. Graf keserapan lawan masa dilakar (Gambarajah 1). Berdasarkan graf ini, graf keserapan lawan masa sehingga 3, 4 dan 5 minit dilakarkan (Gambarajah 2, 3 dan 4).

8. Didapati graf sehingga 4 minit adalah paling linear dan mempunyai nilai korelasi yang tertinggi iaitu $r = 0.996$. Oleh yang demikian, 4 minit adalah masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein dan bacaan keserapan akan diambil pada minit ke 4 bagi setiap tindakbalas semasa penyediaan graf piawai bagi aktiviti tisu kallikrein seterusnya.

Carta aliran : Kaedah penentuan masa optima.



4.4 Penyediaan graf piawai tisu kallikrein.

Sebanyak 1ml air suling steril dimasukkan ke dalam 1 vial tisu kallikrein tulen (250U) untuk penyediaan larutan berkepekatan 250U/ml. Kemudian larutan berkepekatan 10U/ml (100U dalam 10ml larutan) disediakan seperti pengiraan berikut :-

$$M1V1 = M2V2$$

$$250 \text{ U/ml} \times V1 = 10 \text{ U/ml} \times 10 \text{ ml}$$

$$V1 = \frac{10 \text{ U/ml} \times 10 \text{ U/ml}}{250}$$

$$= 0.04 \text{ ml}$$

Sebanyak 0.4ml (400 μ l) telah diambil dari tisu kallikrein tulen berkepekatan 250U/ml dan dicampur dengan 9.6ml air suling steril untuk menyediakan larutan tisu kallikrein tulen berkepekatan 10 U/ml (100 U di dalam 10 ml larutan). Larutan ini akan digunakan seterusnya untuk membuat penyediaan tisu kallikrein dari kepekatan 0 hingga 10 U/ml seperti Jadual I di bawah:

Jadual I : Penyediaan larutan tisu kallikrein tulen pada kepekatan 0 hingga 10 U/ml

U/ml	Dari larutan tisu kallikrein tulen 10U/ml	Air Suling stril
10	1.0ml	0.0ml
9	0.9ml	0.1ml
8	0.8ml	0.2ml
7	0.7ml	0.3ml
6	0.6ml	0.4ml
5	0.5ml	0.5ml
4	0.4ml	0.6ml
3	0.3ml	0.7ml
2	0.2ml	0.8ml
1	0.1ml	0.9ml
0	0ml	1.0ml

4.4.1 Penyediaan graf piawai tisu kallikrein tulen dengan menggunakan kaedah kinetik.

Bagi kaedah kinetik, penyediaan kurva piawai tisu kallikrein tulen adalah seperti berikut :

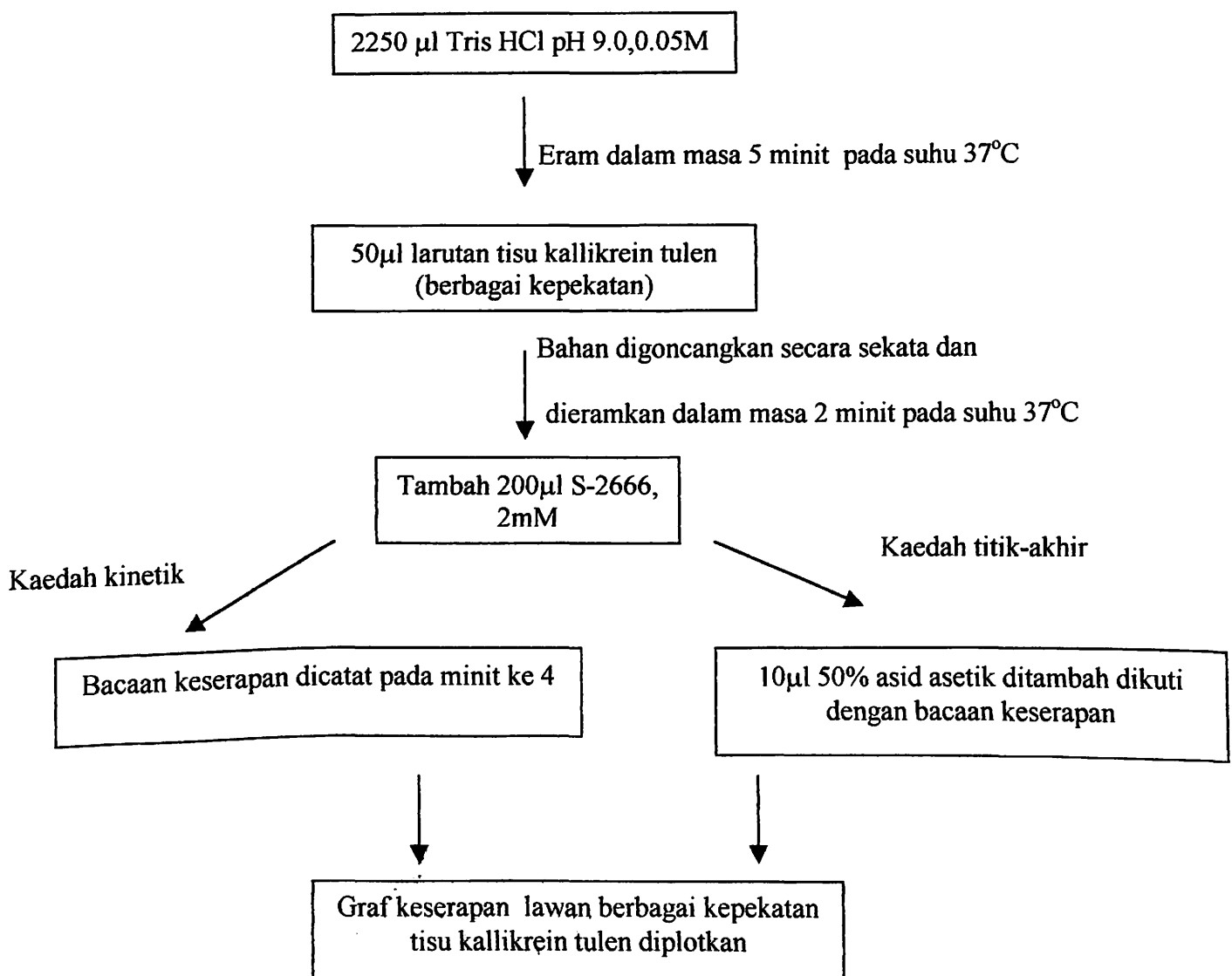
1. 2250 μ l larutan penampan Tris pH 9.0 berkepekatan 0.05 M telah dieramkan di dalam kukusan air pada suhu 37°C selama 5minit.
2. 50 μ l larutan enzim tisu kallikrein tulen yang berkepekatan berbeza telah di tambah dan digoncang sama rata. Larutan ini juga telah dieramkan selama 2 minit pada suhu 37°C.
3. Seterusnya 200 μ l S-2266 berkepekatan 2mmol/L telah ditambah serta digoncang sama rata dan dieramkan pada suhu 37°C.
4. Larutan blank disediakan dengan langkah yang sama kecuali tisu kallikrein tulen diganti dengan 50 μ l larutan Tris HCl.
9. Bacaan keserapan diambil pada minit ke 4 dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 405 nm. Langkah-langkah ini diulang sebanyak 3 kali dan nilai purata diambil dari tiga bacaan bagi setiap tindakbalas.
5. Graf keserapan lawan kepekatan tisu kallikrein dilakarkan.

4.4.2 Penyediaan graf piawai tisu kallikrein dengan menggunakan kaedah titik-akhir (end-point).

1. Penyediaan kurva piawai tisu kallikrein tulen dengan menggunakan kaedah titik-akhir dilakukan dengan menggunakan langkah yang sama seperti 4.4.1 (bernombor 1,2,3, dan 4).

2. Kemudian pada minit ke 4, 10 μ l 50% asid asitik ditambah ke dalam setiap tabung uji untuk menghentikan tindakbalas diantara S-2266 dan tisu kallikrein tulen.
3. Bacaan keserapan diambil dengan menggunakan spektrofotometer pada jarak gelombang 405nm. Langkah-langkah ini diulang sebanyak 3 kali dan nilai purata diambil dari tiga bacaan bagi setiap tindakbalas.
4. Graf keserapan lawan kepekatan berbeza tisu kallikrein tulen dilakarkan.

Carta aliran : Penyediaan pembentukan graf piawai (kaedah kinetik / titik-akhir)

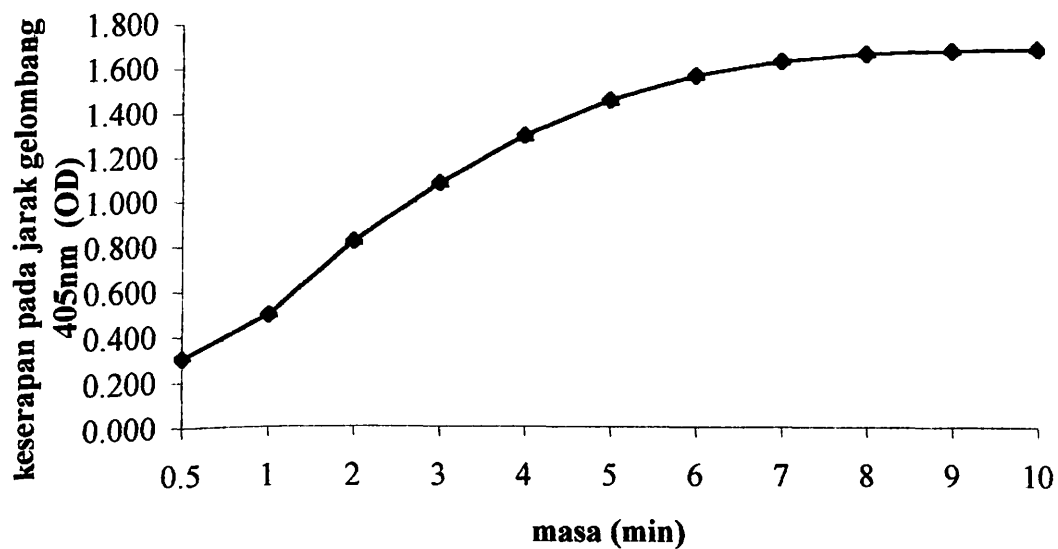


5. KEPUTUSAN DAN PERBINCANGAN

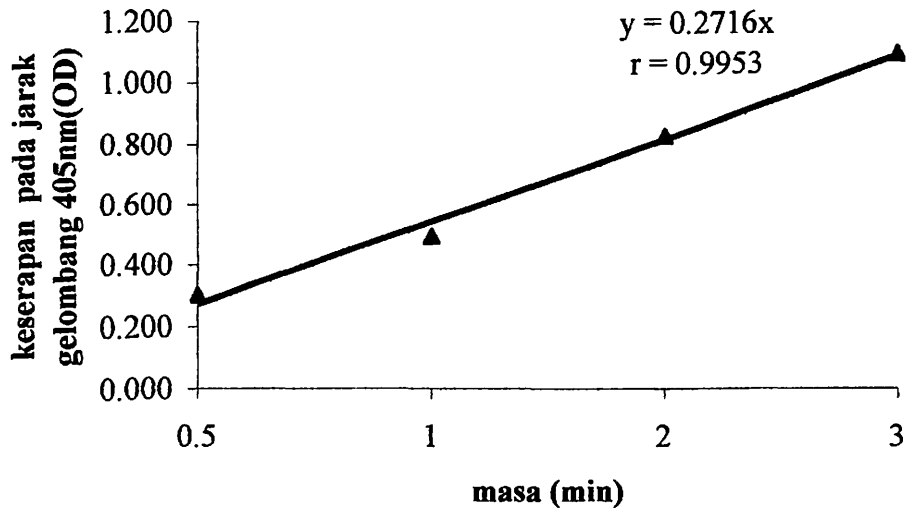
5.1 Penentuan masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein tulen

JADUAL 2: Kecerapan aktiviti tisu kallikrein tulen (60U/ml) sehingga 10 minit.

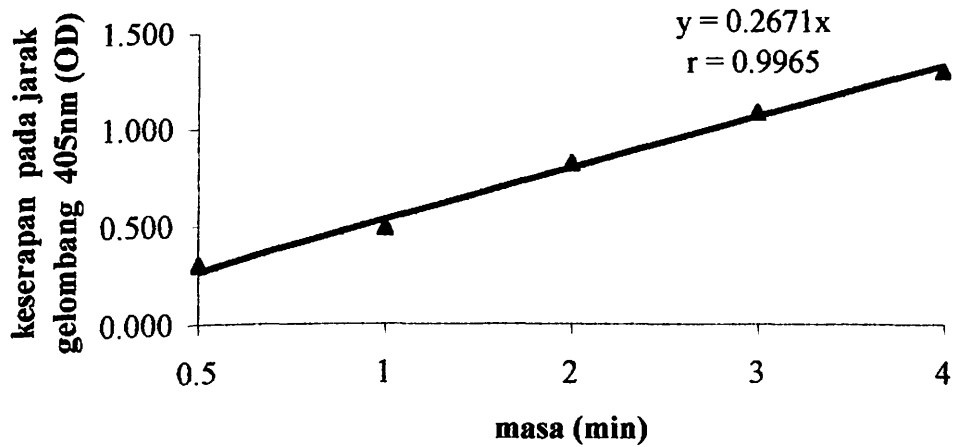
Masa min \ O.D	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.307	0.504	0.804	1.104	1.313	1.469	1.573	1.635	1.663	1.675	1.680
B	0.306	0.498	0.830	1.103	1.327	1.487	1.595	1.654	1.682	1.692	1.696
C	0.297	0.485	0.810	1.093	1.309	1.469	1.579	1.643	1.673	1.686	1.696
purata	0.303	0.496	0.827	1.093	1.309	1.469	1.579	1.643	1.673	1.686	1.691



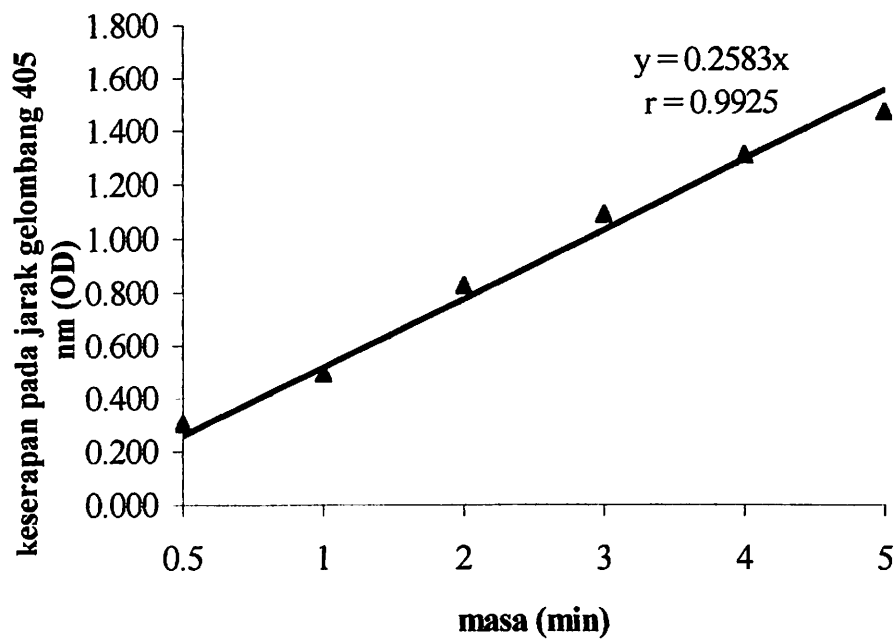
Gambarajah 1: Kecerapan aktiviti tisu kallikrein tulen (60U/ml) melawan masa.



Gambarajah 2: Keserapan aktiviti tisu kallkrein tulen (60U/ml) sehingga 3 minit



Gambarajah 3: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen (60U/ml) sehingga 4 minit.



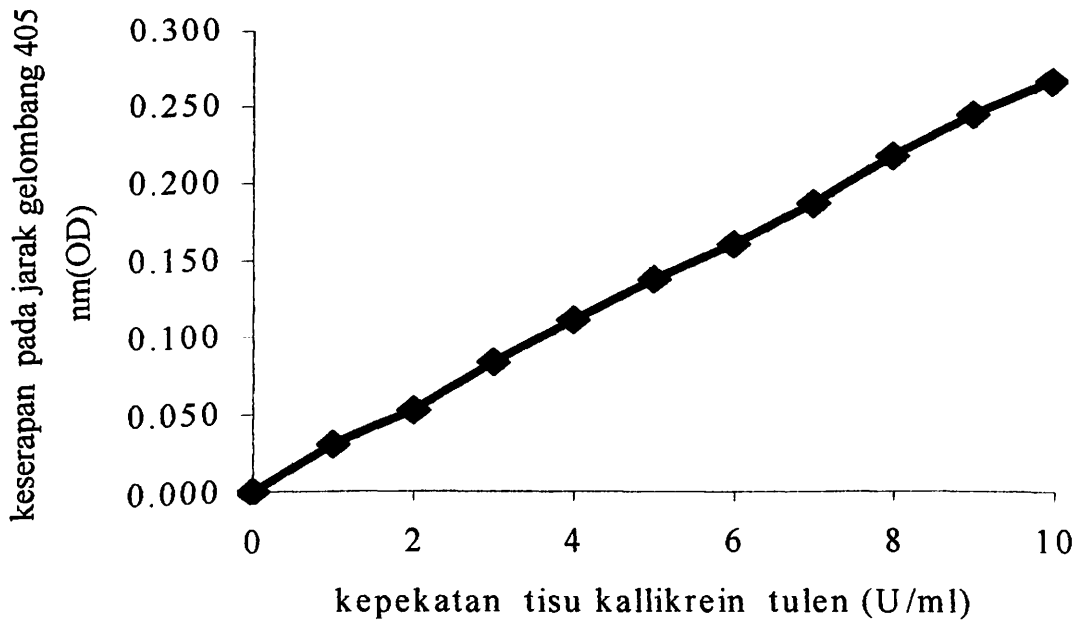
Gambarajah 4: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen (60U/ml) sehingga 5 minit

Di dapati graf keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen (60U/ml) sehingga 4 minit adalah paling linear dan mempunyai nilai korelasi yang paling tinggi iaitu $r = 0.996$. Oleh yang demikian, masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein ini adalah pada minit ke 4 di mana graf yang terhasil adalah paling linear. Masa ini digunakan untuk penyediaan graf piawai bagi aktiviti tisu kallikrein bagi kedua-dua kaedah kinetik dan titik-akhir.

5.2 Graf piawai aktiviti tisu kallikrein dengan menggunakan kaedah kinetik

JADUAL 3: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen pada kepekatan 0 hingga 10U/ml

kepekatan U/ml \ O.D	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.000	0.032	0.049	0.077	0.107	0.122	0.152	0.178	0.207	0.230	0.256
B	0.000	0.030	0.058	0.088	0.117	0.149	0.176	0.191	0.220	0.259	0.276
C	0.000	0.028	0.049	0.086	0.111	0.143	0.155	0.192	0.226	0.246	0.267
purata	0.000	0.030	0.052	0.084	0.112	0.138	0.161	0.187	0.218	0.245	0.266

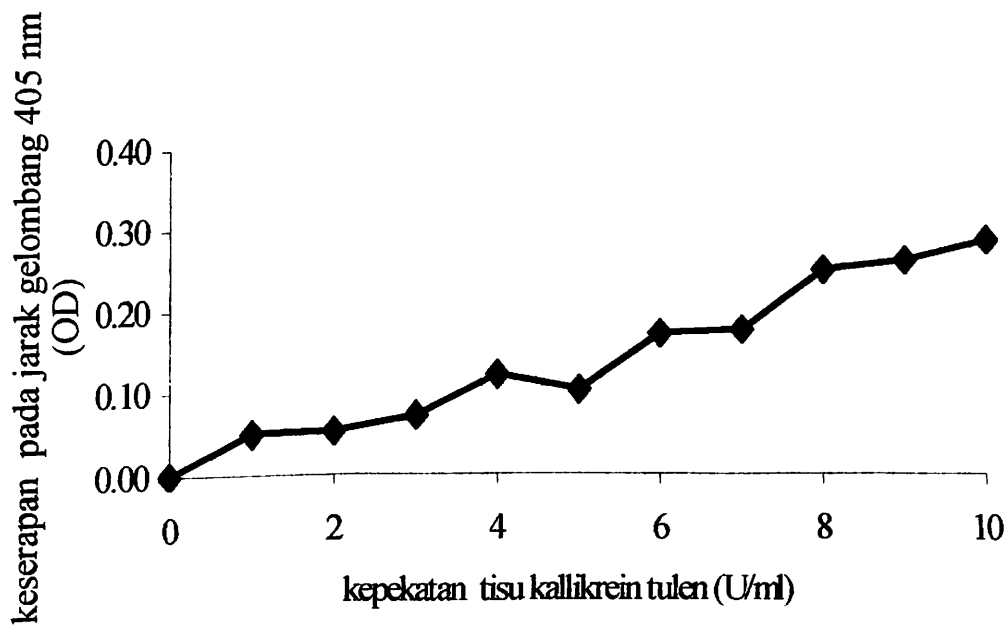


Gambarajah 5: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen pada kepekatan 0 hingga 10 U/ml (kaedah kinetik)

5.3 Graf piawai aktiviti tisu kallikrein tulen dengan menggunakan kaedah titik-akhir

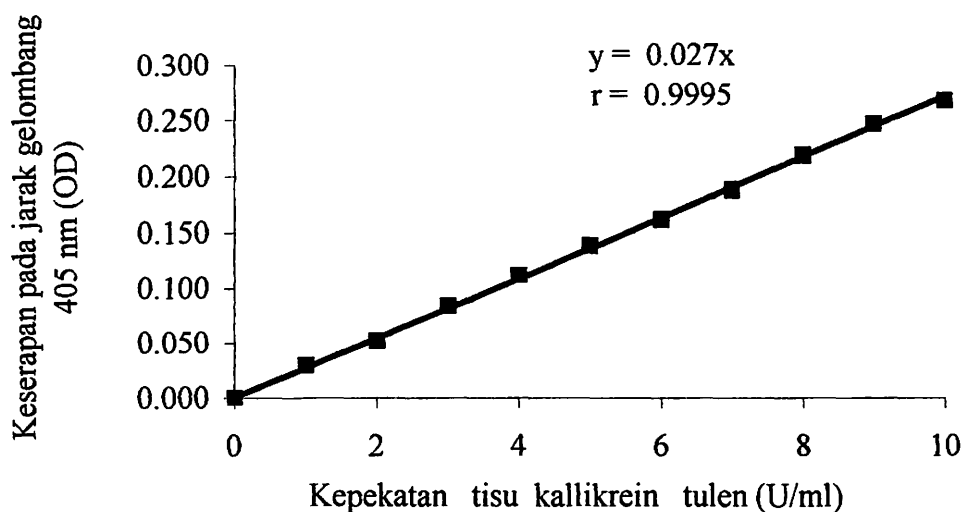
JADUAL 4: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen pada kepekatan 0 hingga 10U/ml

kepekatan U/ml \ O.D	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0.000	0.049	0.045	0.074	0.125	0.105	0.175	0.173	0.247	0.253	0.295
B	0.000	0.048	0.056	0.068	0.115	0.097	0.169	0.182	0.256	0.268	0.284
C	0.000	0.052	0.050	0.067	0.117	0.103	0.167	0.186	0.253	0.259	0.289
Mean	0.000	0.049	0.050	0.069	0.119	0.102	0.171	0.180	0.252	0.260	0.289



Gambarajah 6: Keserapan aktiviti tisu kallikrein tulen pada kepekatan 0 hingga 10 U/ml (kaedah titik-akhir).

5.4 Graf piawai bagi aktiviti tisu kallikrein.



Didapati graf yang terhasil dengan menggunakan kaedah kinetik adalah lebih linear berbanding dengan kaedah titik akhir. Oleh yang demikian kaedah kinetik adalah kaedah yang paling sesuai bagi penyediaan graf piawai bagi aktiviti tisu kallikrein. Didapati graf piawai yang terhasil mempunyai nilai korelasi yang tinggi iaitu 0.9995.

6. KESIMPULAN

Didapati masa optima bagi aktiviti tisu kallikrein tulen di mana ia menghasilkan graf yang paling linear, adalah pada minit ke 4. Didapati juga kaedah kinetik adalah kaedah yang paling sesuai bagi penyediaan graf piawai bagi tisu kallikrein berbanding dengan kaedah titik-akhir. Graf piawai ini boleh digunakan untuk menentukan aktiviti tisu kallikrein di dalam tisu atau cecair badan seperti urin pada manusia dan haiwan dalam kajian yang berkaitan dengan sistem kallikrein-kinin. Adalah dicadangkan parameter lain

seperti koefisien inter- dan intra-esei serta sensitiviti graf ditentukan pada masa akan datang memandangkan ianya memerlukan peruntukan yang besar.

7. RUJUKAN

1. Duncan J Campbell (2001). The Kallikrein – kinin system in humans. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* : 28, 1060- 1065.
2. J.N.Sharma, K. Uma, A. P. M. Yusuf (1998). Left ventricular hypertrophy and its relation to the cardiac kinin – forming system in hypertensive and diabetic rats. *International Journal of Cardiology* : 63: 229- 235.
3. Lim Phaik Ee, Ang Tian Tse. Prinsip dan eksperimen enzim. Dewan Bahasa dan Pustaka. 1988 : (27- 32)

8. Lampiran

1. Larutan Penampakan 0.05M Tris HCl ,pH 9.0.

Berat molikul Tris HCl = 157.6g

Untuk membuat larutan 200ml 0.05M :

0.05mol/L----- 0.05 x 157.6 = 7.88g (di dalam 1000ml)

⇒ 200ml----- $\frac{200 \times 7.88}{1000} = 1.576g$

1000

1.576g Tris HCl telah dilarutkan di dalam 50ml air suling steril, pH larutan adalah 9 dan dijadikan isipadu sebanyak 200ml dengan menggunakan kelalang isipadu.

2. 60U/ml tisu kallikrein pankreas 'porcine'

1 vial tisu kallikrein dari pankreas 'porcine' mengandung 250U telah dilarutkan di dalam 1ml air suling steril untuk menyiapkan larutan 250U/ml.

Untuk menyediakan larutan 60U/ml :

$$M_1V_1=M_2V_2$$

$$250U/ml \times V_1= 60U/ml \times 1ml$$

$$V_1= 0.24 ml$$

Untuk menyediakan larutan 60U/ml , sebanyak 0.24ml dari larutan 250U/ml telah ditambah dengan 0.76ml air suling steril.

3. 2mM substrat chromogenik S-2266.

Sebanyak 21.57ml air suling steril ditambah ke dalam botol yang mengandung substrat sebanyak (MW=579.6g).