

© 2003 Desriani
Makalah Pribadi
Pengantar Ke Falsafah Sains (PPS702)
Program Pasca Sarjana / S3
Institut Pertanian Bogor
Desember 2003

Posted 18 December 2003

Dosen:
Prof. Dr. Ir. Rudy C. Tarumingkeng (Penanggung jawab)
Prof. Dr. Ir. Zahrial Coto

PQQGDH (PIROLOQUINOLINE QUINONE GLUCOSE DEHIDROGINASE) SEBAGAI BIOSENSOR GLUKOSA PADA PENGOBATAN PENYAKIT DIABETES MELLITUS

Oleh:

Desriani

G361030101/Bio

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu kondisi terganggunya metabolisme didalam tubuh dikarenakan ketidakmampuan tubuh membuat atau menyuplai hormon insulin yang menyebabkan terjadinya peningkatan gula darah melebihi nilai normal. Dikalangan masyarakat luas, penyakit ini lebih dikenal sebagai penyakit gula atau kencing manis. Dari berbagai penelitian, terjadi kecendrungan peningkatan prevalensi DM. Di Indonesia prevalensi DM sekitar 4%, kekerapannya lebih tinggi di daerah urban dibandingkan didaerah rural. Angka tertinggi dikota Manado dengan prevalensi 6,1%. Tahun 2020 diperkirakan akan ada 7 juta penderita DM di Indonesia dan di dunia

diperkirakan mencapai 306 juta jiwa. Ada 4 pilar utama dalam mengelola penyakit DM ini, meliputi:

1. Pengetahuan mengenai penyakit.
2. Perencanaan diet.
3. Latihan jasmani.
4. Pemakaian obat peroral ataupun penyuntikkan insulin.

Latihan jasmani menjadi bagian yang sangat penting dalam pengobatan penyakit DM. Olah raga yang dianjurkan adalah olah raga aerobik yang sifatnya sesuai CRIPE (continuous, rhythmical, interval, progressive, endurance training). Olah raga membuat tubuh lebih bugar, meningkatkan sistem kekebalan tubuh, mempertahankan elastisitas tubuh, membakar kalori yang berlebihan, membuat sel lebih sensitif terhadap insulin sehingga dosis obat dapat berkurang. Pilar 1,2 dan 3 wajib dijalankan oleh penderita DM. Pilar ke 4 hanya untuk penderita yang gagal meregulasi darahnya dengan cara latihan jasmani, sehingga obat peroral ataupun suntikkan insulin menjadi bagian dari kehidupan sehari-hari. (Anonim, 2003).

Penyuntikkan insulin pada terapi pengobatan DM harus dilakukan dengan sangat hati-hati. Jika insulin yang disuntikkan terlalu banyak, penderita DM akan mengalami *insulin shock*, yang dapat menyebabkan kerusakan permanen pada otak. Jadi penting sekali untuk menetapkan konsentrasi gula darah, sehingga bisa ditentukan berapa dosis insulin yang akan diinjeksikan.

Alat pengukur gula darah

Gula darah yang berbentuk glukosa pada awalnya diukur secara kimiawi menggunakan *paper strip* yang dapat berubah warna karena reaksi kimia dengan glukosa. Akan tetapi, produk ini kurang populer karena banyak mengandung kelemahan seperti akurasi rendah, kecepatan pengukuran lambat serta ukurannya relatif besar. Pada saat yang hampir bersamaan, seorang ahli fisiologi dan biokimia bernama Leland Clark mengembangkan alat pengukur berdasarkan reaksi biokimia dengan enzim GOD (Glucose Oxidase) dan kemudian mengukurnya secara elektrokimia.

Alat pengukur atau sensor yang berbasis pada molekul biologis dikenal dengan istilah biosensor. Biosensor yang dikembangkan oleh Clark adalah biosensor pertama di dunia. Tetapi penggunaan enzim GOD sebagai biosensor glukosa memiliki kelemahan.

Mekanisme kerja enzim ini sangat bergantung pada keberadaan oksigen, akibatnya alat pengukur darah ini dapat memberikan hasil yang berbeda dari individu yang sama. Hal ini dapat terjadi, karena sampel darah dapat mengandung kadar oksigen terlarut yang berlainan, bergantung pada asalnya.

Pada saat ini ada dua perusahaan biosensor dunia yang berusaha mengubah penggunaan enzim GOD dengan enzim yang mengkatalisis reaksi reduksi, sehingga tidak bergantung pada kadar oksigen, yaitu enzim PQQ Glucose dehidrogenase (PQQGDH). Berbeda dengan enzim GOD, enzim PQQGDH memerlukan banyak campur tangan manusia, mulai dari produksi massalnya dengan bioteknologi sampai kepada upaya rekayasa protein untuk memperbaiki karakter enzimatikanya bagi aplikasi dalam biosensor. (Witarto, 2003a)

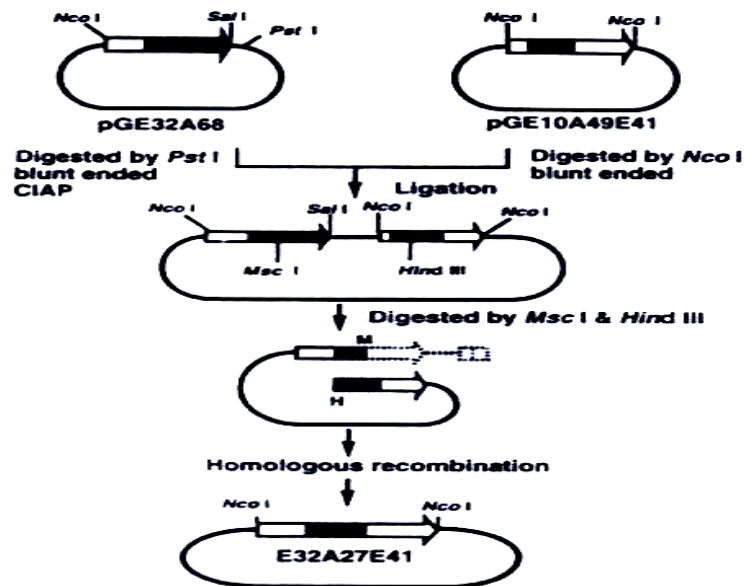
PQQGDH (Piruloquinoline Quinone Glucose Dehidrogenase)

Seperti telah disebutkan sebelumnya bahwa PQQGDH merupakan alternatif baru digunakan sebagai biosensor glukosa. PQQGDH tidak saja independent terhadap kadar oksigen, juga memiliki aktivitas yang tinggi. Lebih lanjut mengenai PQQGDH, dari studi struktur kristalnya diketahui bahwa piruloquinoline quinon merupakan kofaktor enzim ini. Pengikatan PQQ terhadap enzim GDH yaitu melalui interaksi polar (Ourbrie, *et al.*, ?). Ada dua jenis Glucose dehidrogenase, yaitu tipe terikat membrane (m-GDH kadang disebut GDH-A) yang ditemukan pada banyak bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus* dan sebagainya, tipe lainnya yaitu tipe soluble (s-GDH, kadang disebut GDH-B) yang hanya ditemukan pada *A. calcoaceticus*. (Witarto, 2001). Dari analisis struktur sekunder, PQQGDH-A terdiri dari dua domain yaitu domain dekat N-terminal merupakan domain yang terikat dengan membran dan domain yang berada pada daerah C-terminal merupakan domain yang hidrofilik.. Enzim PQQGDH-A merupakan enzim yang akan dimanfaatkan dan diaplikasikan sebagai biosensor glukosa. (Witarto dan Sode, 2001). Tidak seperti enzim GOD, enzim PQQGDH hanya diproduksi oleh bakteri yang bersangkutan dalam jumlah yang kecil. Untuk itu diperlukan pengembangan sistem produksi massal yang efisien serta ekonomis.

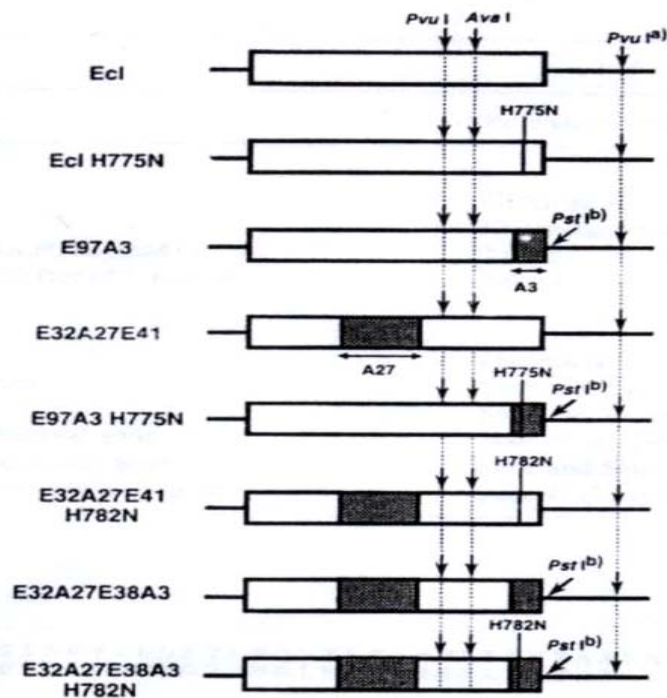
Menurut Suhartono (1999), bahwa dengan melakukan mutasi dan rekayasa genetika dapat dilakukan usaha untuk meningkatkan produksi protein yang dikehendaki. Secara teoritis, kita dapat memindahkan dan mengisolasi gen apa saja yang diinginkan, mengintegrasikannya kedalam plasmid tertentu dan selanjutnya melakukan amplifikasi gen yang diinginkan sehingga dapat meningkatkan produksi protein fungsional yang diturunkan dari gen tersebut.

Teknologi rekombinasi DNA memerlukan penguasaan akan teknik isolasi plasmid, penyambungan gen yang diinginkan dengan plasmid (apabila yang bersangkutan kebetulan tidak berasal dari plasmid yang sama)., mencari kondisi yang tepat untuk memasukkan plasmid kedalam bakteri atau mikroba inang, seleksi inang, seleksi mikroba yang telah dimasuki plasmid diantara mikroba lainnya dan pada akhirnya ekspresi gen tersebut pada bakteri inang. Bukan hanya plasmid, tetapi virus bakteri (bakteriofag) juga dapat dimanfaatkan untuk memindahkan dan meningkatkan jumlah gen. Proses untuk memproduksi enzim juga dapat memanfaatkan teknik ini.

Dari hasil penelitian Yoshida *et al* (1999) yang mengkonstruksi gen kimera dari *Acinetobacter calcoaceticus* dan *Eschericia coli* didapatkan enzim PQQGDH dengan stabilitas terhadap suhu, toleransi terhadap EDTA yang lebih tinggi dan tidak merubah aktivitas enzimatis dalam artian tetap memiliki aktivitas yang tinggi sebagai mana pada tipe liarnya.. Sebagai inang untuk memproduksi enzim dari gen kimera tersebut digunakan *E.coli*. Pada gambar dibawah ini dapat dilihat proses konstruksi gen yang dilakukan.



Gambar 1. Konstruksi gen kimera PQQGDH, E32A27E41



Gambar 2. Konstruksi genetic PQQGDH. Berasal dari gen strutural gen PQQGDH *A. calcoaceticus*, berasal dari *E. coli*

a), b) Situs pengenalan enzim restriksi pada vector ekspresi, pTrc99A. H775N, H782N, substitusi asam amino pada His775 atau His782 menjadi asparagin

Dari beberapa konstruksi gen kimera pada Gambar 2 diatas, gen kimera E32A27E38A3 H782N merupakan konstruksi gen yang memberikan stabilitas terhadap suhu dan toleransi yang tertinggi dibandingkan konstruksi gen kimera yang lain.

Bertani Protein (*molecular farming*)

Dalam kaitan produksi protein dalam jumlah massal, disamping menggunakan *E. coli* sebagai inang untuk memproduksi protein/enzim rekombinan, juga dapat menggunakan inang jenis lain mulai dari mikroba (bakteri, jamur, kapang) sampai kepada sel hewan, mahluk hidup tingkat tinggi (ulat sutra, domba) dan tanaman.

Dibandingkan menggunakan bakteri, dengan menggunakan tanaman sebagai inang untuk produksi enzim akan didapatkan hasil yang lebih banyak dan juga lebih ekonomis dibandingkan menggunakan hewan sebagai inangnya. Sebagai contoh, untuk memproduksi protein antibodi dengan menggunakan tanaman, biayanya 500-600 USD per-gram protein, sementara dengan sel hewan setidaknya perlu 10 kali lebih mahal. Untuk membiakkan sel hewan diperlukan berbagai media dan reagen seperti vitamin, dan lain-lain yang sangat mahal, sementara dengan menggunakan tanaman cukup dengan menyediakan pupuk dan menyediakan lahan kosong dimana saja dan menanamnya.

Proses produksi enzim dengan menggunakan tanaman sebagai inang disebut juga dengan bertani protein (*molecular farming*). Penggunaan enzim yang diproduksi oleh tanaman dapat dibagi menjadi dua yaitu yang memerlukan ekstraksi sampai didapatkan protein murni, serta yang kedua dimana produk proteinnya dapat langsung dikonsumsi. (Witarto, 2003b).

Penutup

Diharapkan dengan semakin berkembang nya ilmu pengetahuan dan teknologi, terapi untuk pengobatan penyakit diabetes mellitus akan semakin mudah dan murah.

Sehingga nantinya terapi pengobatan penyakit ini dapat menjangkau seluruh strata sosial

Daftar Pustaka

- Anonim. 2003. Mengelola Diabetes Mellitus. <http://www.detik.health.com>.
- Ourbrie, A., H. Rozeboom, K.Kaulk and B. Dijkstra. ?. Crystal Structure of The Biosensor Glucose Dehydrogenase.
<http://www.xray.c2/ecm/abstract/d/4/371.htm>.
- Suhartono. M.T. 1999. Enzim dan Bioteknologi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Witarto, A.B. 2001. Protein Engineering: Perannya dalam Bioindustri dan Prospeknya di Indonesia. Disampaikan pada seminar on-Air Bioteknologi untuk Indonesia Abad 21 1-14 Februari 2001 synergy Forum-PPI Tokyo Institute of Technology.
- Witarto, A.B. and K.Sode. 2001. Increasing the Hydrophobic Interaction between Terminal W-motifs enhances the Stability of Salmonella typhimurium sialidase. A general Strategy for the Stabilization of β -propeller Protein Fold. Protein Engineering. 14:891-896
- Witarto, A.B. 2003a. Membedah Alat Pengukur Gula Darah.
<http://www.kompas.com/kompas-cetak/0310/07/inspirasi/607270.htm>
- Witarto, A.B. 2003b. Bertani Protein. Kompas. Senin, 14 April 2003.
- Yoshida, H., K. Kojima, A.B. Witarto and K. Sode. 1999. Engineering a Chimeric Pyrroquinoline quinone Glucose Dehydrogenase: Improvement of EDTA, Thermal stability and Substrate Specificity.