



**PRINSIP BIOASSAY
DALAM
PENGEMBANGAN OBAT
BAHAN ALAM**

ROLLANDO

PRINSIP BIOASSAY DALAM PENGEMBANGAN OBAT BAHAN ALAM

Rollando



PRINSIP BIOASSAY DALAM PENGEMBANGAN OBAT BAHAN ALAM

Penulis:

Rollando



Editor dan Tata Letak:

Soetam Rizky Wicaksono

Penerbit

CV. Seribu Bintang

Malang – Jawa Timur - Indonesia

Profile : www.SeribuBintang.co.id

Katalog : www.SeribuBintang.web.id

Email : info@seribubintang.co.id

FB : www.fb.com/cv.seribu.bintang

IG : @penerbitseribubintang

Anggota IKAPI no. 320/JTI/2021



ISBN : 978-623-7000-46-4

Edisi Pertama, September 2022

Hak Cipta dilindungi oleh Undang-undang

Daftar Isi

Daftar Isi.....	i
PRAKATA.....	1
Bab I. Pendahuluan	5
1.1 KARAKTERISTIK UJI SKRINING IDEAL UNTUK SKRINING ALAMI EKSTRAK PRODUK	7
1.2 UJI BIODIVERSITAS ATAU BERBASIS SEL.....	8
1.3 FORMAT PENGUJIAN	10
1.4 SUMBER REAGEN	11
1.5 PENGUJIAN RASIO SIGNAL-TO-NOISE.....	12
1.6 PENGUJIAN INKUBASI.....	13
1.7 PENGUJIAN MANIPULASI.....	14
1.8 KOMPATIBILITAS DMSO.....	15
1.9 SKRINING KOMPATIBILITAS SUMBER BAHAN	16
BAB II. UJI ENZIM.....	17
2.1 PERTIMBANGAN UNTUK PENGEMBANGAN UJI ENZIM	18
2.2 PEMILIHAN SUMBER ENZIM	19
2.3 PEMILIHAN KONSENTRASI ENZIM.....	22
2.4 PEMILIHAN SUBSTRAT DAN KONSENTRASI SUBSTRAT.....	23
2.5 PEMILIHAN KONSENTRASI KOFAKTOR	30
2.6 PEMILIHAN TITIK AKHIR PENGUJIAN	31
2.7 PEMILIHAN PENGUJIAN PH.....	32
2.8 PEMILIHAN SUHU PENGUJIAN	32
2.9 KOMPATIBILITAS DMSO.....	33
2.10 KOMPATIBILITAS EKSTRAK.....	33
2.11 PROFIL INHIBITOR.....	34
2.12 PENGHAMBATAN KOMPETITIF	35
2.13 PENGHAMBATAN TIDAK KOMPETITIF	36
2.14 PENGHAMBATAN NONKOMPETITIF	37

**BAB III. PENGEMBANGAN UJI ENZIM HIGH THROUGHPUT UNTUK
SKRINING PRODUK BAHAN ALAM.....39**

BAB IV. UJI FUNGSIONAL RESEPTOR BERBASIS SEL51

*4.1 UJI FUNGSIONAL UNTUK RESEPTOR G-PROTEIN
BERPASANGAN53*

4.2 UJI FUNGSIONAL RESEPTOR BERBASIS SEL UMUM58

4.3 UJI CAMP FLASHPLATE61

4.4 UJI REPORTER ELEMEN GEN RESPON CAMP68

4.5 JALUR TRANSDUKSI SINYAL RESEPTOR GQ BERPASANGAN ..70

*4.6 PENGUJIAN HIGH THROUGHPUT UNTUK RESEPTOR GQ
BERPASANGAN75*

*4.7 UJI FUNGSIONAL HIGH THROUGHPUT UNTUK SALURAN ION
LIGAN-GATED78*

4.8 UJI FUNGSIONAL PROTEIN RESEPTOR TYROSINE KINASE.....80

4.9 UJI FUNGSIONAL HIGH THROUGHPUT UNTUK RPTK84

4.10 UJI FUNGSIONAL RESEPTOR SITOKIN90

4.11 UJI FUNGSIONAL RESEPTOR CAMPURAN.....92

BAB V. UJI PENGIKAT RADIOLIGAND101

*5.1 PERTIMBANGAN PENTING UNTUK MENGEMBANGKAN UJI
PENGIKATAN RADIOLIGAND.....103*

5.2 SUMBER RESEPTOR DAN KONSENTRASI PENGUJIAN.....104

5.3 EVALUASI LINEARITAS MEMBRAN SEL115

5.4 WAKTU ASOSIASI DAN DISOSIASI.....118

5.5 EVALUASI ISOTERM SATURASI.....124

5.6 STUDI PERSAINGAN.....127

5.7 UJI PENGIKATAN RADIOLIGAND ALTERNATIF.....134

5.8 PENGUJIAN FLASHPLATE136

5.9 UJI KEDEKATAN KILAUAN140

5.10 UJI PELAT SCINTISTRIP.....143

5.11 PENGIKATAN RESEPTOR BERBASIS FLUORESENSI.....145

BAB VI. BEBERAPA BIOASSAY BERBASIS ENZIM IN VITRO UMUM ...149

6.1 UJI PENGHAMBATAN PROTEASE150

6.2 UJI PENGHAMBATAN TIROSINASE158

6.3 UJI PENGHAMBATAN HYALURONIDASE162

6.4 UJI PENGHAMBATAN ACETYLCHOLINESTERASE168

6.5 UJI PENGHAMBATAN ENZIM B-LAKTAMASE173

6.6 UJI PENGHAMBATAN 5-LIPOXYGENASE	178
DAFTAR PUSTAKA	179
INDEX	179
GLOSARIUM	179



PRAKATA

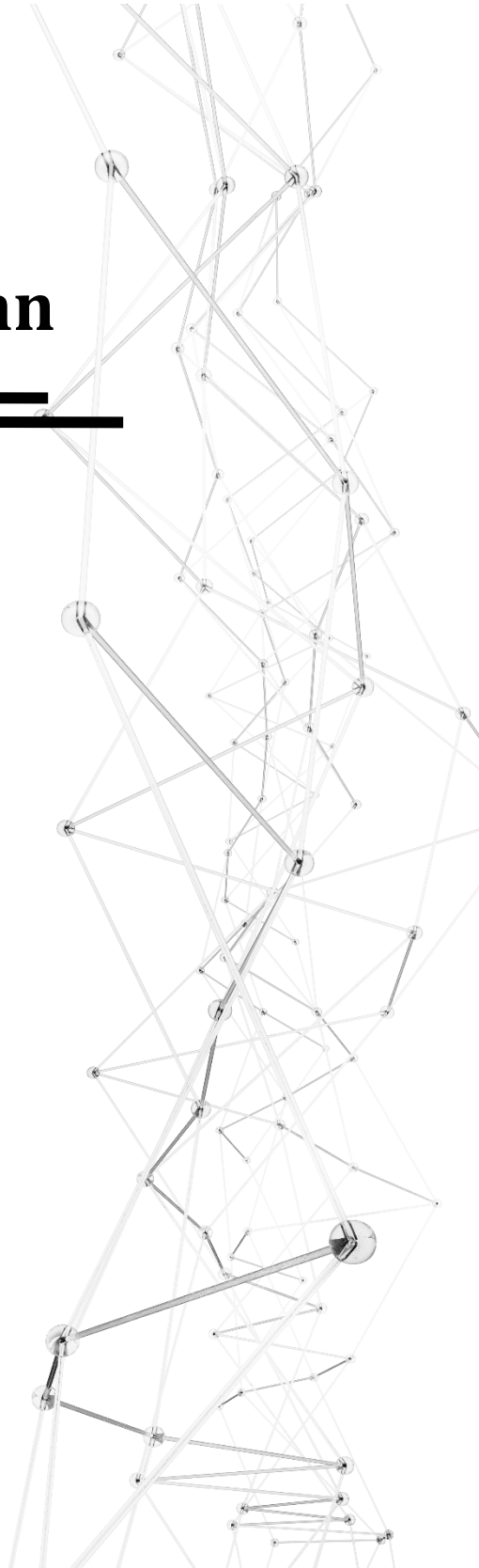
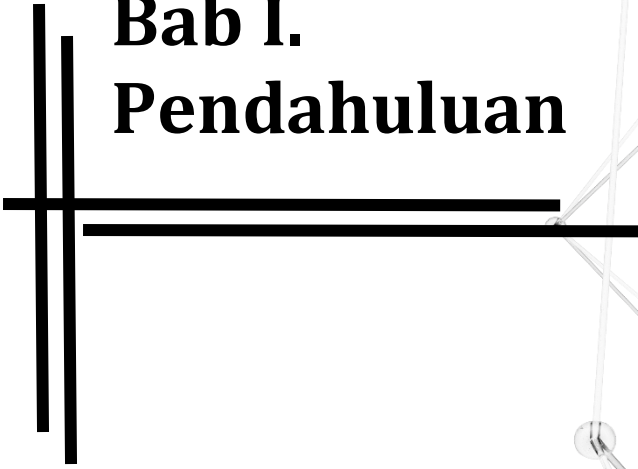
Buku referensi “Prinsip Bioassay dalam Pengembangan Obat Bahan Alam” diciptakan untuk memberikan pandangan dan dasar dalam pengaplikasian metode bioassay dalam eksplorasi senyawa bahan alam untuk dibuat produk farmasi. Banyak metode yang digunakan untuk skrining senyawa aktif, namun dasar menggunakan metode tersebut masih belum banyak untuk dibahas. Buku ini adalah buku edisi pertama yang bertujuan untuk membantu pemahaman dalam bioassay dan prinsip dasar bioassay.

Buku ini banyak membahas tentang dasar penggunaan enzim dalam bioassay. Enzim merupakan protein unik yang tersusun atas banyak asam amino. Setiap enzim memiliki karakter yang spesifik dan mekanisme aksi yang berbeda-beda. Buku ini diawali dengan pendahuluan yang membahas penggunaan enzim dalam bioassay. Selanjutnya dilanjutkan dengan pembahasan mengenai pertimbangan untuk pengembangan uji enzim. Kemudian dibahas pengembangan uji enzim untuk skrining produk bahan alam yang berisi konsep uji bioassay dengan enzim farnesyltransferase. Pada bab selanjutnya, dibahas tentang uji fungsionalisasi reseptor berbasis sel yang akan menjelaskan bagaimana peran reseptor dalam induksi signal yang berakibat timbulnya stimulus dan efek. Kemudian pada pembahasan selanjutnya, akan dibahas konsep uji dengan menggunakan radioligan dan macam-macam uji bioassay.

Buku referensi ini disusun dengan dasar literatur primer dari jurnal internasional bereputasi yang menghasilkan penelitian yang dapat dipercaya hasilnya. Buku ini juga output dari “Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi 2022” No. 045/SP2H/PT/LL7/2022. Buku ini jauh dari kata sempurna sehingga masukan dan saran selalu kami harapkan untuk memperbaiki isi dari buku ini. Semoga buku ini dapat menjadi panduan bagi yang akan melakukan penelitian.

Halaman ini sengaja dikosongkan

Bab I. Pendahuluan



Ekstrak dari produk bahan alami telah menjadi sumber keragaman molekuler yang berharga dalam banyak program penemuan obat dan beberapa obat terapeutik penting telah diisolasi dari produk alami. Namun, skrining bahan tersebut sangat rumit karena mengandung campuran metabolit sekunder yang kompleks. Keberhasilan untuk mengidentifikasi terapi baru adalah menggunakan reseptor *in vitro* dan tes enzim. Namun, sebagian besar tergantung pada desain yang tepat dan validasi uji skrining. Kunci sukses lainnya adalah desain pengujian dengan kecepatan hasil yang lebih tinggi (*higher throughput*) sehingga sejumlah besar ekstrak dapat diskriminasi dengan cepat dan hemat biaya. Munculnya metode kimia kombinatorial juga telah meningkatkan pentingnya metode skrining *higher throughput* untuk pengujian bioaktivitas. Bagian ini berisi deskripsi rinci tentang desain dan validasi reseptor serta uji enzim yang digunakan untuk skrining produk reaksi kimia kombinatorial dan ekstrak produk alami. Selain itu, teknologi pengujian baru yang dirancang untuk meningkatkan hasil pengujian juga akan disajikan.

1.1 Karakteristik Uji Skrining Ideal untuk Skrining Alami Ekstrak Produk

Ada beberapa karakteristik penting yang terkait dengan uji skrining primer yang digunakan untuk skrining ekstrak produk alami dan produk reaksi kimia kombinatorial.

Tabel 1. Karakteristik Pemeriksaan Skrining Optimal

- Biokimia atau berbasis sel
- Format pengujian: plat mikrotiter 96-sumur atau 384-sumur, dapat diotomatisasi
- Sumber reagen: reagen rekombinan manusia
- Sinyal pengujian: rasio sinyal terhadap kebisingan yang tinggi dan andal
- Inkubasi pengujian: 30–60 menit pada suhu sekitar
- Manipulasi pengujian: minimal
- Kompatibel dengan DMSO
- Kompatibilitas sumber bahan: dengan semua jenis ekstrak produk alami dan keragaman bahan kimia lainnya.

1.2 Uji Biokimia atau Berbasis Sel

Secara umum, ada dua jenis pengujian yang digunakan untuk skrining *high throughput*: pengujian biokimia atau berbasis sel. Pengujian berbasis biokimia menggunakan reseptor atau enzim manusia yang sebagian dimurnikan atau seluruhnya sebagai reagen pengujian. Keuntungan menggunakan uji biokimia adalah penggunaan kultur sel yang terus menerus tidak diperlukan, hambatan permeabilitas sel tidak ada (untuk target intraseluler), dan penentuan mekanisme kerja ekstrak aktif atau senyawa yang diidentifikasi umumnya tidak rumit. Kerugian potensial dari uji biokimia adalah bahwa kondisi pengujian tidak mencerminkan lingkungan fisiologis yang ada dalam sel dan seringkali tidak memungkinkan pengembangan pengujian fungsional.

Demikian pula, ada beberapa keuntungan dan kerugian menggunakan uji berbasis sel dalam skrining produk reaksi kimia kombinatorial atau ekstrak produk alami. Salah satu keuntungannya adalah bahwa beberapa target molekuler yang menarik dapat terkandung dalam satu pengujian. Misalnya, uji berbasis sel yang melibatkan pengukuran produksi IL-2 oleh sel T yang distimulasi akan berisi beberapa target molekuler yang jika dihambat akan menyebabkan penurunan produksi IL-2. Beberapa target molekuler ini akan mencakup tirosin kinase $p56^{lck}$ $p59^{fyn}$, ZAP70, tirosin fosfatase CD45, serta target lain yang terlibat dalam transduksi sinyal sel T yang mengarah ke produksi IL-2.

Keuntungan lain menggunakan tes berbasis sel adalah bahwa tes fungsional dapat dikembangkan. Contoh uji reseptor berbasis sel fungsional untuk reseptor berpasangan protein-G akan menjadi salah satu dimana seperti cAMP atau kalsium intraseluler diukur. Keuntungan menggunakan uji fungsional berbasis sel adalah uji tersebut dapat digunakan untuk membedakan agonis dan antagonis. Manfaat lain menggunakan uji berbasis sel adalah reagen tidak perlu dimurnikan, dan sel hanya perlu ditumbuhkan. Satu hal penting yang potensial dari pengujian berbasis sel, yang melibatkan jalur transduksi sinyal kompleks yang mengarah ke sinyal titik akhir pengujian, adalah bahwa penentuan tempat kerja campuran atau ekstrak reaksi aktif mungkin rumit. Salah satu perhatian terpenting dari skrining ekstrak produk alami dalam uji berbasis sel adalah potensi insiden tinggi ekstrak aktif positif palsu karena sitotoksitas seluler nonspesifik. Karena itu, ekstrak aktif yang diidentifikasi dalam uji berbasis sel harus dievaluasi secara rutin untuk sitotoksitas nonspesifik.

1.3 Format Pengujian

Pertimbangan penting lainnya untuk desain uji skrining reseptor dan enzim adalah rancangan tes. Pengujian harus dirancang dalam bentuk pelat mikrotiter 96-sumur atau 384-sumur. Setelah dalam konfigurasi ini, perangkat penanganan cairan berbasis pelat mikrotiter dan pembaca pelat titik akhir dapat digunakan untuk meningkatkan hasil pengujian secara dramatis. Selain itu, sistem robotika berbasis plat mikrotiter juga dapat dimanfaatkan. Dengan demikian, instrumentasi yang telah digunakan untuk skrining *high throughput* dari molekul organik kecil juga dapat diterapkan pada skrining *high throughput* dari ekstrak produk alami. Logikanya, semakin banyak ekstrak yang diskriminasi per pengujian dalam program penemuan obat produk alami, semakin besar kemungkinan bahwa metabolit sekunder yang berharga akan diidentifikasi. Hasil yang lebih besar, seperti pengujian skala kecil juga harus diterapkan untuk skrining ekstrak produk alami. Salah satu pertimbangan untuk skrining produk alami dengan *high throughput* adalah bahwa ekstrak aktif akan terakumulasi, kemudian isolasi senyawa kimia dan identifikasi metabolit sekunder aktif. Produk alami kimia biasanya merupakan komponen yang lebih memakan waktu daripada proses penemuan produk alami.

1.4 Sumber Reagen

Skrining reseptor dan enzim harus menggunakan reagen yang murah, memberikan hasil yang konsisten, dan dapat diandalkan. Secara tradisional, jaringan hewan telah digunakan sebagai sumber reagen untuk uji skrining, tetapi sumber ini kurang diminati karena masalah biaya dan "hak-hak perlindungan hewan". Lebih penting lagi, industri farmasi telah mengakui dari pengalaman masa lalu bahwa homologi urutan tinggi untuk reseptor dan enzim yang diisolasi dari spesies yang berbeda tidak berarti bahwa protein manusia akan memiliki karakteristik farmakologis yang serupa. Idealnya, uji skrining utama yang digunakan dalam program penemuan obat harus menggunakan reagen yang menyerupai kondisi fisiologis manusia. Garis sel manusia yang mengekspresikan reseptor atau enzim yang diinginkan dapat berfungsi sebagai sumber reagen yang baik jika sel mengandung populasi murni dari reagen yang diinginkan dan jika pemurnian cukup sederhana. Namun, sumber reagen yang paling diinginkan untuk uji skrining adalah protein rekombinan manusia. Keuntungan dari memproduksi protein rekombinan adalah mereka berfungsi sebagai sumber reagen yang murah, andal, dan murni. Keuntungan penting lainnya menggunakan protein rekombinan adalah bahwa karakteristik fisik yang diinginkan dapat diperkenalkan. Beberapa sistem ekspresi protein dapat digunakan termasuk sel mamalia, bakteri, ragi dan sel

serangga. Sel mamalia adalah pilihan ekspresi terbaik jika uji fungsional dikembangkan karena biasanya mengandung sistem transduksi sinyal yang sesuai dan yang dibutuhkan. Salah satu perhatian dengan produksi protein rekombinan dalam sistem ekspresi non-mamalia adalah apakah mereka akan mengalami modifikasi pasca-translasi yang sama yang terjadi secara fisiologis. Karena hal penting ini, karakteristik protein yang dihasilkan dalam sistem ekspresi pengganti harus dievaluasi secara cermat untuk memastikan bahwa mereka cocok.

1.5 Pengujian Rasio *Signal-to-Noise*

Uji primer yang digunakan untuk skrining produk reaksi kimia kombinatorial dan ekstrak produk alami memerlukan sinyal rasio *signal-to-noise* yang tinggi. Ini sangat relevan untuk skrining produk alami mentah karena kebisingan yang melekat tinggi terkait dengan skrining campuran kompleks metabolit sekunder ini. Dalam mengembangkan pengujian reseptor dan enzim, setiap variabel pengujian harus dievaluasi untuk menentukan apakah variabel tersebut dapat mempengaruhi tingkat pengujian kebisingan. Variabel yang ditemukan untuk meningkatkan sinyal dan mengurangi kebisingan harus disesuaikan untuk memaksimalkan rasio *signal-to-noise*. Misalnya, uji kebisingan dalam uji pengikatan reseptor radioligan biasanya berhubungan dengan pengikatan radioligan yang tidak spesifik. Ada beberapa

variabel uji yang dapat mempengaruhi pengikatan nonspesifik termasuk: radioligan dan konsentrasi membran yang muncul dalam pengujian. Untuk pengujian enzim, pengujian kebisingan dapat menjadi kontribusi dari banyak faktor yang berbeda, seperti pengujian reseptor seringkali dapat dikurangi dengan manipulasi parameter pengujian yang berbeda.

1.6 Pengujian Inkubasi

Periode pengujian inkubasi merupakan pertimbangan kritis untuk mengembangkan uji reseptor dan enzim. Untuk pengujian reseptor, inkubasi harus memiliki durasi yang cukup untuk mencapai pengikatan keadaan tunak, yang merupakan periode di mana laju asosiasi ligan dengan reseptor sama dengan laju disosiasi ligan dari reseptor. Idealnya, setelah kesetimbangan tercapai, pelat uji dapat diatur tanpa diproses lebih lanjut jika reseptor dan radioligan stabil. Ini merupakan keuntungan saat skrining dalam jumlah besar karena reaksi pengikatan tidak harus dihentikan pada interval yang tepat. Inkubasi untuk penetapan kadar enzim lebih dibatasi dan harus dilakukan pada kondisi laju awal dimana reaksi adalah orde pertama terhadap konsentrasi substrat. Suhu inkubasi adalah variabel lain yang perlu dipertimbangkan untuk pengujian reseptor dan enzim. Laju reaksi akan lebih cepat pada suhu pengujian yang lebih tinggi. Namun, inkubasi yang dilakukan pada suhu ruang lebih praktis karena

inkubator tidak diperlukan. Meskipun sebagian besar reaksi dapat dilakukan pada suhu ruang, ada beberapa pengecualian dan akan dibahas pada bagian berikut.

1.7 Pengujian Manipulasi

Pengujian sederhana dimana pengujian manipulasi minimal dilakukan akan memiliki hasil skrining terbesar. Beberapa pengujian melibatkan terlalu banyak manipulasi untuk membuatnya praktis untuk skrining sejumlah besar ekstrak produk alami. Untuk uji pengikatan reseptor, sekarang ada pergeseran dari uji pengikatan filtrasi tradisional ke uji homogen dimana reagen ditambahkan, inkubasi dilakukan, dan pelat dibaca di pembaca titik akhir. Dengan demikian, langkah-langkah skrining yang melelahkan untuk menyelesaikan radioligan bebas dan terikat dapat dihilangkan. Demikian pula, uji enzim homogen sedang dikembangkan yang memungkinkan penghilangan langkah-langkah pemisahan yang melelahkan untuk menyelesaikan substrat dari produk. Poin utamanya adalah bahwa pengujian yang ideal akan memiliki jumlah uji manipulasi yang minimum, sehingga memungkinkan uji *throughput* yang lebih besar.

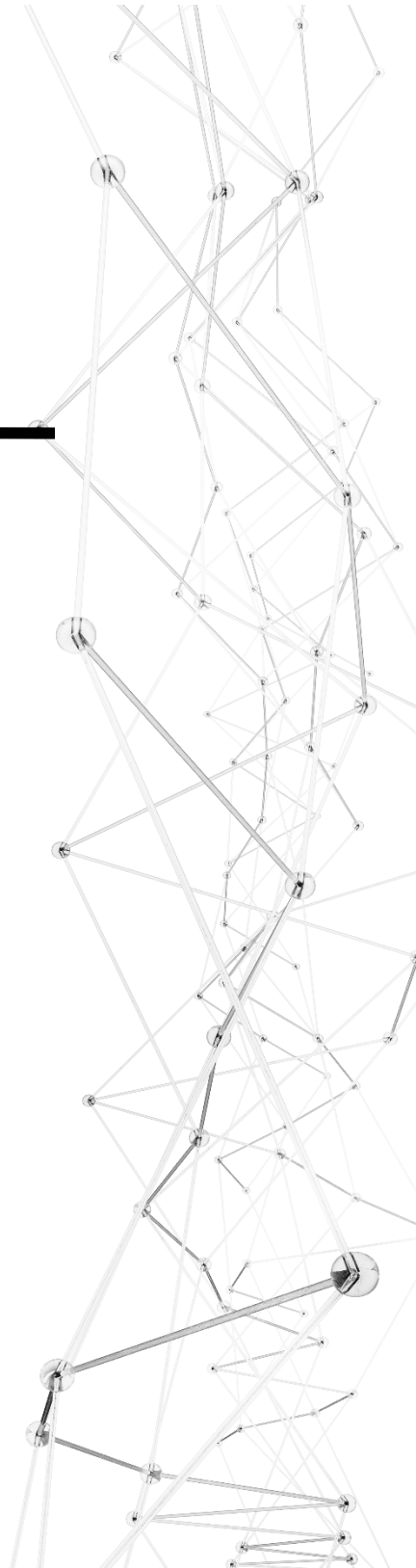
1.8 Kompatibilitas DMSO

Ekstrak produk bahan alam disuspensikan dalam DMSO untuk skrining dalam pengujian. Pemeriksaan yang optimal harus mentolerir konsentrasi DMSO yang tinggi untuk memaksimalkan kemungkinan bahwa metabolit sekunder dalam ekstrak akan tetap larut selama skrining. Untuk pengujian apapun, sangat penting bahwa toleransi DMSO dievaluasi dengan hati-hati. Sebagian besar uji pengikatan reseptor yang menggunakan preparat membran akan mentolerir hingga 10% DMSO. Sebagian besar uji enzim juga akan mentolerir tingkat DMSO yang relatif tinggi. Uji berbasis sel memiliki kompatibilitas yang jauh lebih rendah dan biasanya tidak akan mentolerir konsentrasi uji akhir di atas 0,5% DMSO.

1.9 Skrining Kompatibilitas Sumber Bahan

Sebagian besar program penemuan obat produk bahan alam terdiri dari skrining ekstrak yang berbeda dari berbagai bahan sumber termasuk jamur, tanaman, serangga, dan organisme laut. Selain itu, untuk organisme apa pun, biasanya menyiapkan berbagai jenis ekstrak kimia untuk skrining. Untuk setiap pengujian skrining, penting untuk skrining sampel yang relatif besar dari setiap jenis ekstrak selama validasi pengujian untuk mengevaluasi kompatibilitasnya dengan pengujian yang diberikan. Banyak uji memiliki kapasitas yang berbeda untuk berbagai jenis ekstrak dan sumber bahan. Umumnya, penentuan konsentrasi ekstrak akhir yang optimal dari setiap jenis ekstrak produk alami tertentu dilakukan dengan menguji berbagai pengenceran ekstrak dari beberapa organisme, dan menentukan konsentrasi yang memberikan tingkat hit aktif yang dapat diterima, yang umumnya antara 0,1 dan 1%. Selama masa uji skrining, biasanya konsentrasi uji akhir dari kumpulan ekstrak yang diberikan dapat bervariasi untuk mencapai tingkat hit yang berbeda.

BAB II. UJI ENZIM



Enzim tertentu adalah target molekuler yang penting untuk penemuan obat dan banyak program penemuan obat memasukkan target enzim dalam uji skrining primer. Umumnya, pengujian ini menggunakan enzim manusia yang dimurnikan sebagian atau seluruh dan melibatkan pengukuran pembentukan produk dengan berbagai metode pengujian termasuk pengujian radiometrik, kolorimetri, dan fluorometri. Bagian berikut menjelaskan pertimbangan penting untuk mengembangkan dan memvalidasi uji enzim untuk senyawa sintetis dan skrining ekstrak produk alami. Selain itu, contoh pengembangan dan validasi uji enzim spesifik disajikan sebagai contoh.

2.1 Pertimbangan untuk Pengembangan Uji Enzim

Berikut ini merupakan variabel uji penting yang harus dipertimbangkan dalam mengembangkan uji enzim *high throughput* untuk skrining produk reaksi kimia kombinatorial:

- Sumber enzim
- Konsentrasi uji akhir enzim
- Pemilihan substrat dan konsentrasi pengujian akhir
- Persyaratan kofaktor dan konsentrasi pengujian akhir
- Pemilihan titik akhir pengujian
- Uji pH
- Suhu pengujian

- Profil penghambat
- Kompatibilitas DMSO
- Kompatibilitas Ekstrak

Sebelum mencoba mengembangkan uji enzim, penting untuk mempelajari sebanyak mungkin detail mengenai mekanisme reaksi enzim. Informasi penting untuk dievaluasi adalah apakah suatu reaksi enzim melibatkan substrat tunggal atau ganda, mekanisme katalisis, kofaktor apa yang diperlukan, dan faktor-faktor yang mengatur aktivitas enzimatik. Semua informasi ini akan berdampak tidak hanya pada desain pengujian enzim yang tepat, tetapi juga dalam membangun mekanisme kerja inhibitor yang ditemukan selama skrining.

2.2 Pemilihan Sumber Enzim

Salah satu pertimbangan pertama untuk mengembangkan uji enzim menyangkut pemilihan sumber enzim yang layak. Jika memungkinkan, enzim yang digunakan dalam pengujian untuk penemuan obat harus berasal dari sumber manusia. Sebagian besar enzim yang diisolasi dari spesies yang berbeda akan sangat homolog tetapi mungkin tidak selalu memiliki semua karakteristik yang sama dari enzim manusia. Untuk memastikan bahwa pengujian relevan untuk menemukan inhibitor enzim manusia yang diminati, enzim manusia harus digunakan. Jaringan manusia dapat berfungsi sebagai sumber enzim manusia tetapi umumnya

sulit diperoleh. Sel manusia atau garis sel adalah sumber enzim yang lebih praktis. Dalam beberapa kasus, mungkin perlu menggunakan enzim dari sumber non-manusia jika sumber manusia yang baik tidak tersedia. Jika terjadi kasus demikian, penting untuk mengevaluasi setiap metabolit sekunder aktif yang diidentifikasi dalam uji utama untuk aktivitas melawan enzim manusia yang sesuai.

Setelah sumber enzim diidentifikasi, tugas selanjutnya adalah memurnikan enzim dalam jumlah yang cukup untuk skrining. Pemurnian beberapa enzim dari sel bisa sangat melelahkan dan hasil bisa rendah, baik karena adanya jumlah enzim yang rendah atau degradasi enzim selama pemurnian. Dalam beberapa kasus, ekspresi seluler suatu enzim dapat ditingkatkan sebelum pemurnian. Contohnya adalah peningkatan ekspresi dari NO sintase yang dapat diinduksi ketika sel RAW 264.7 seperti makrofag tikus dikultur dengan adanya interferon tikus dan LPS. Masalah lain tentang pemurnian enzim dari sel menyangkut kemurnian. Banyak enzim ada sebagai isozim yang berhubungan dengan banyak struktur. Garis sel yang mengekspresikan isozim tertentu yang diinginkan perlu diidentifikasi dan sarana untuk menyelesaikannya dari isozim lain, jika ada, perlu ditetapkan. Dalam banyak kasus, kultur sel perlu ditingkatkan untuk menyediakan cukup sel untuk isolasi enzim yang diinginkan.

Sebuah metode yang relatif mudah untuk memproduksi

enzim untuk uji skrining adalah mengkloning dan mengekspresikan enzim manusia yang menarik dalam sistem ekspresi yang sesuai. Sel yang mengekspresikan enzim manusia rekombinan umumnya dapat digunakan untuk memurnikan sejumlah besar protein murni dengan harga murah. Dimungkinkan juga untuk merekayasa kelompok tertentu menjadi enzim rekombinan sehingga dapat lebih mudah dimurnikan. Salah satu contohnya adalah pengenalan residu histidin C-terminal ke dalam enzim sitosol yang memungkinkan pemurnian satu langkah sederhana menggunakan kolom pengkelat besi. Beberapa sistem ekspresi yang berbeda dapat dipertimbangkan untuk mengekspresikan protein rekombinan manusia termasuk sel mamalia, bakteri, sel serangga, atau ragi. Dalam memilih sistem ekspresi, penting untuk menetapkan bahwa sistem ekspresi tidak mengekspresikan protein endogen terkait dan protein yang diekspresikan akan mengalami modifikasi pasca-translasi yang sama yang terjadi secara fisiologis. Ada sejumlah pemasok reagen berbeda yang menjual enzim rekombinan yang dapat digunakan untuk pengujian skrining.

2.3 Pemilihan Konsentrasi Enzim

Konsentrasi akhir dari suatu enzim yang termasuk dalam uji skrining adalah pertimbangan penting lainnya dalam pengembangan uji. Karena enzim manusia yang dimurnikan mungkin mahal dan sulit untuk diisolasi, jumlah enzim yang termasuk dalam pengujian harus diminimalkan tetapi masih cukup untuk menghasilkan rasio sinyal kebisingan yang diinginkan. Variabel ini mudah diperiksa dengan melakukan percobaan dimana jumlah variabel enzim ditambahkan ke pengujian. Karena banyak enzim yang dimurnikan mungkin labil selama penyimpanan, kondisi penyimpanan yang sesuai harus ditetapkan. Selain itu, stabilitas enzim harus dievaluasi secara berkala selama periode penyimpanan.

2.4 Pemilihan Substrat dan Konsentrasi Substrat

a) Uji Enzim Reversibel Satu Substrat

Reaksi enzim yang paling sederhana adalah reaksi yang melibatkan satu substrat dan konversi menjadi produk bersifat reversibel. Secara umum, substrat yang dipilih untuk pengujian substrat tunggal harus memiliki afinitas yang tinggi (K_m rendah) untuk interaksi dengan enzim. Ini akan memungkinkan penggunaan substrat yang sedikit dalam pengujian serta memberikan pengujian sensitif untuk mengidentifikasi inhibitor yang bersaing dengan substrat untuk situs aktif enzim. Biasanya, substrat yang relevan secara fisiologis digunakan yang umumnya memiliki K_m rendah untuk enzim. Namun, beberapa pengujian menggunakan sintesis peptida atau substrat peptida turunan. Substrat turunan ini penting untuk memiliki afinitas yang relatif tinggi terhadap enzim sehingga uji enzim sensitif dalam mengidentifikasi metabolit sekunder aktif yang mungkin ada dalam konsentrasi rendah.

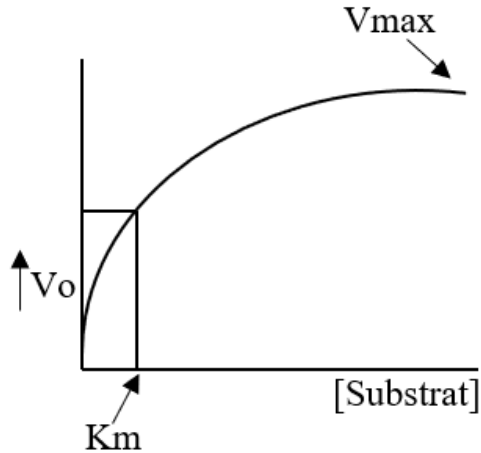
K_m suatu enzim untuk substrat tertentu dapat dengan mudah ditentukan secara eksperimental dari mengevaluasi hubungan konsentrasi substrat ($[S]$) dengan laju reaksi awal (v_o). Hubungan seperti tersebut ditunjukkan pada Gambar 1.

Pada konsentrasi substrat yang rendah, kecepatan reaksi awal hampir sebanding dengan konsentrasi substrat dan dengan

demikian reaksi mendekati orde satu terhadap substrat. Namun, ketika konsentrasi substrat meningkat, laju reaksi menjadi tidak tergantung pada konsentrasi substrat dan mendekati laju konstan. Dalam kisaran konsentrasi substrat ini, reaksi menjadi orde nol terhadap konsentrasi substrat karena enzim dijenuhkan dengan substrat. Menurut persamaan Michaelis-Menton untuk reaksi substrat tunggal, $v_o = v_{maks}[S] / K_m + [S]$, K_m sama dengan konsentrasi substrat dimana kecepatan reaksi awal adalah setengah dari kecepatan maksimal.

Hubungan Michaelis-Menten dapat diubah secara aljabar ke dalam bentuk grafik lain yang dapat memberikan informasi kinetik yang penting. Salah satu contohnya adalah plot Lineweaver-Burke dimana kebalikan dari kecepatan reaksi ($1/v_o$) diplot kebalikan dari konsentrasi substrat ($1/[substrat]$). Gambar 2 menunjukkan plot reaksi enzimatik substrat tunggal.

Perpotongan y sama dengan $1/v_{maks}$ dan perpotongan x sama dengan $1/K_m$. Transformasi lain yang berguna adalah plot Eadie-Hofstee di mana v_o diplot berlawanan dengan $v_o/[S]$. Plot seperti itu ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 1. Hubungan Konsentrasi Substrat Dengan Laju Reaksi Enzim Satu Substrat Sederhana

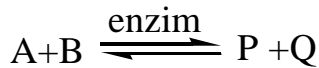
Perpotongan y sama dengan v_{maks} , perpotongan x sama dengan v_{maks}/K_m , dan kemiringan (*slope*) adalah nilai dari K_m . Plot Eadie-Hofstee akan cenderung memperbesar penyimpangan dari linearitas yang mungkin tidak begitu terlihat dalam transformasi Lineweaver-Burke.

Secara umum, direkomendasikan bahwa nilai K_m substrat dimasukkan dalam uji enzim satu substrat. Di bawah nilai ini, rasio sinyal kebisingan mungkin terlalu rendah. Penggunaan konsentrasi di atas K_m akan meningkatkan rasio sinyal kebisingan, tetapi juga membuat pengujian kurang sensitif dalam mendeteksi inhibitor kompetitif karena enzim menjadi lebih jenuh dengan substrat. Dengan demikian, keseimbangan antara sinyal kebisingan dan uji sensitivitas perlu dibuat dalam

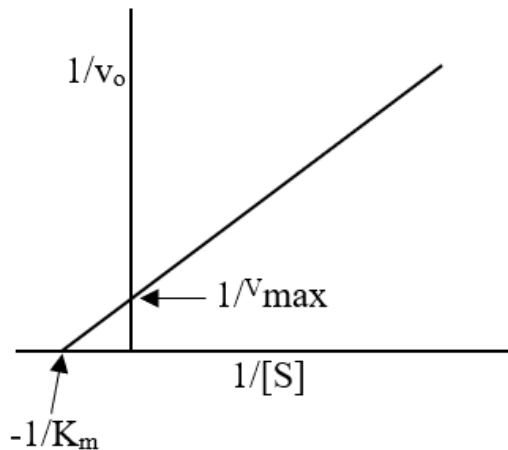
mengembangkan uji enzim.

b) Reaksi Enzim Reversibel Dua Substrat

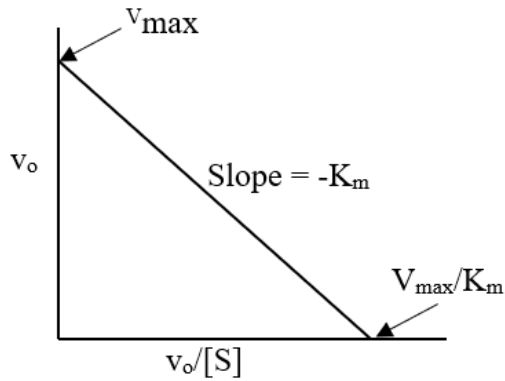
Penentuan K_m reaksi enzim dua substrat mirip dengan metode yang digunakan untuk reaksi satu substrat. Reaksi:



Konsentrasi B ditetapkan pada tingkat jenuh dan konsentrasi A divariasikan untuk menentukan pengaruhnya terhadap kecepatan reaksi dan nilai K_m untuk A, ditunjuk sebagai K_{mA} . Umumnya minimal tiga konsentrasi tetap yang berbeda dari B diuji dalam analisis ini.



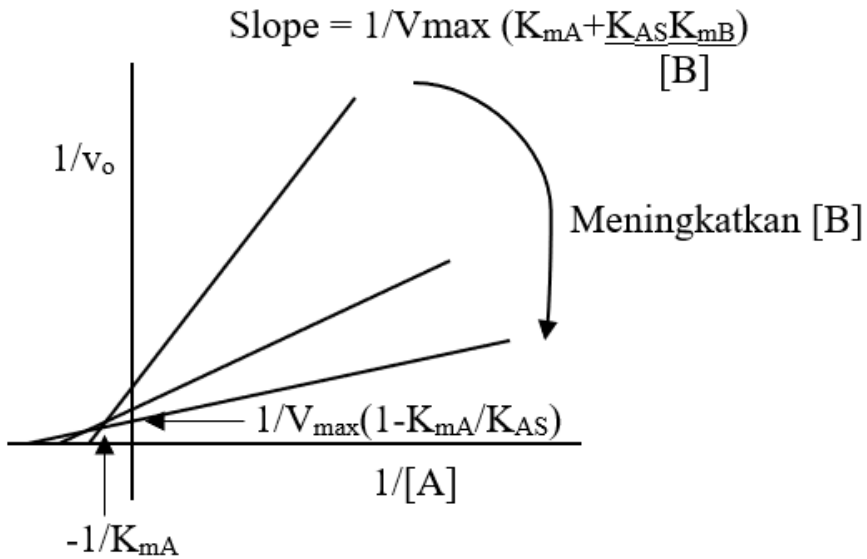
Gambar 2. Plot Lineweaver-Burke



Gambar 3. Plot Eadie-Hofstee

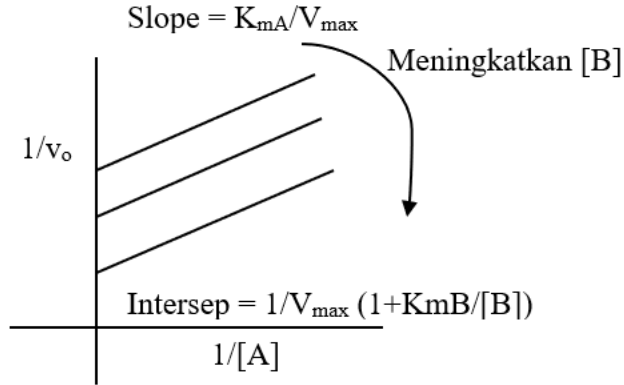
Sebaliknya, K_{mB} ditentukan secara eksperimental dengan menetapkan konsentrasi A pada konsentrasi jenuh dan memvariasikan konsentrasi B. Reaksi enzim dua substrat umumnya terbagi dalam dua kelas umum yang berbeda, reaksi perpindahan tunggal dan ganda. Dalam reaksi enzim perpindahan tunggal, baik substrat A dan B perlu terikat pada enzim untuk membentuk kompleks terner. Substrat A dan B dapat berasosiasi dengan enzim baik dalam urutan acak atau berurutan. Dalam reaksi enzim perpindahan ganda, satu substrat harus mengikat enzim dan satu produk harus dilepaskan sebelum substrat kedua dapat mengikat dan memisahkan dari enzim. Plot Lineweaver-Burke (Gambar 4) dapat digunakan untuk membedakan mekanisme perpindahan tunggal dan ganda untuk reaksi enzim dua substrat. Plot berikut menjelaskan karakteristik reaksi dua-substrat yang teratur di mana konsentrasi A bervariasi dengan

adanya tiga konsentrasi tetap yang berbeda dari substrat B.



Gambar 4. Plot Lineweaver-Burke dari reaksi enzimatik dua substrat

Plot Lineweaver-Burke pada Gambar 5 mewakili reaksi enzim dua substrat dengan perpindahan ganda. Dalam hal ini, konsentrasi substrat A divariasikan dengan adanya tiga konsentrasi tetap yang berbeda dari substrat B.



Gambar 5. Plot Lineweaver-Burke dari reaksi enzimatik perpindahan ganda

Menggunakan pendekatan di atas, parameter kinetik untuk reaksi enzim dua substrat dapat ditentukan secara eksperimental. Parameter ini harus dibandingkan dengan informasi kinetik dalam literatur jika ada. Dalam reaksi dua substrat, harus ditentukan apakah pengujian harus bias untuk mendeteksi inhibitor interaksi substrat A atau B dengan enzim. Sebagai contoh, mari kita pertimbangkan bahwa uji protein kinase akan dikembangkan. Reaksi enzimatik protein kinase melibatkan dua substrat, ATP dan peptida yang akan difosforilasi. Jika maksud skrining adalah untuk mengidentifikasi senyawa yang menghambat pengikatan akseptor peptida fosfat dan bukan penghambat pengikatan ATP, pengujian harus mencakup jumlah ATP dan nilai K_m peptida yang terfosforilasi. Dengan cara ini pengujian bias menjadi lebih sensitif untuk mengambil inhibitor kompetitif hanya dari satu dari dua substrat dalam pengujian.

2.5 Pemilihan Konsentrasi Kofaktor

Banyak enzim membutuhkan kofaktor agar aktivitas dapat maksimal. Bukan ruang lingkup bagian ini untuk menjelaskan berbagai jenis kofaktor dan perannya dalam katalisis untuk enzim yang berbeda. Namun, sangat penting bahwa kofaktor yang diperlukan diidentifikasi dan dimasukkan ketika mengembangkan tes enzim. Setelah kofaktor diidentifikasi, penting untuk menentukan konsentrasi apa yang dibutuhkan untuk aktivitas enzim yang optimal. Secara umum, konsentrasi yang melebihi saturasi harus dimasukkan dalam uji skrining sehingga penghambat pengikatan kofaktor atau depletor kofaktor tidak diidentifikasi dalam uji skrining. Misalnya, uji untuk enzim NO sintase harus mengandung jumlah kofaktor yang diperlukan NADPH, tetrahydrobiopterin, kalsium, dan kalmodulin.

2.6 Pemilihan Titik Akhir Pengujian

Untuk setiap pengujian enzim, biasanya ada beberapa titik akhir yang berbeda yang dapat dipilih untuk pengujian tersebut. Berbagai jenis pengujian ini umumnya mencakup pengujian radiometrik, kolorimetri, dan fluorometrik. Pengujian radiometrik sangat sensitif dan dapat dilakukan otomatisasi pengujian. Namun, banyak uji radiometrik memerlukan resolusi substrat dan produk berlabel. Satu pengecualian adalah uji enzim radiometrik menggunakan teknologi SPA. Uji radiometrik menurun penggunaannya dalam uji skrining volume tinggi karena pertimbangan keamanan dan biaya tinggi yang terkait dengan pembuangan limbah radioaktif. Uji kolorimetri biasanya memiliki sensitivitas yang lebih rendah tetapi juga dapat menerima skrining *throughput* yang tinggi. Salah satu masalah terpenting dengan skrining ekstrak produk alami dalam uji kolorimetri adalah bahwa banyak ekstrak produk alami diwarnai dan ini dapat mengganggu pengukuran titik akhir. Uji fluorometrik sangat sensitif dan dapat menerima skrining *throughput* yang tinggi. Mirip dengan uji kolorimetri, ekstrak produk alami dapat mengganggu pembacaan titik akhir karena adanya senyawa fluoresen atau senyawa pendinginan fluoresensi. Uji berbasis fluoresensi tampaknya mendapatkan popularitas lebih dalam program skrining dan mungkin juga mengandung rasio sinyal kebisingan yang cukup untuk memungkinkan miniturisasi pengujian yang diantisipasi

dalam waktu dekat. Polarisasi fluoresensi dan uji fluoresensi yang diselesaikan dengan waktu diterapkan pada uji enzim seperti uji protease.

2.7 Pemilihan Pengujian pH

Sebagian besar enzim memiliki nilai pH dimana aktivitasnya maksimal. Hubungan aktivitas enzim dengan pH untuk sebagian besar enzim adalah fungsi berbentuk lonceng. Dalam mengembangkan uji enzim, penting untuk menentukan pH optimal hanya dengan mengukur aktivitas pada nilai pH yang berbeda dengan adanya konsentrasi substrat yang jenuh. Bentuk hubungan di atas juga akan bervariasi dengan konsentrasi substrat karena K_m substrat biasanya tergantung pada pH.

2.8 Pemilihan Suhu Pengujian

Suhu pengujian juga merupakan variabel penting untuk dievaluasi ketika mengembangkan pengujian enzim. Secara umum, laju reaksi enzim meningkat dengan meningkatnya suhu. Laju sebagian besar reaksi enzim menjadi dua kali lipat dengan setiap kenaikan 10 °C. Namun, pada beberapa peningkatan suhu, enzim dapat menjadi terdenaturasi atau lebih rentan terhadap proteolisis, sehingga membatasi suhu inkubasi. Dari sudut pandang praktis adalah menguntungkan untuk melakukan uji

enzim pada suhu ruang sekitar sehingga inkubator tidak diperlukan. Namun, untuk reaksi enzimatik V_{maks} rendah tertentu, suhu yang lebih tinggi mungkin diperlukan sehingga inkubasi dapat dilakukan untuk jangka waktu yang praktis dan nyaman.

2.9 Kompatibilitas DMSO

Ekstrak produk alami kering biasanya disuspensikan kembali dalam DMSO sebelum pengujian di tes. Semakin tinggi konsentrasi DMSO yang ada dalam pengujian, semakin tinggi kemungkinan metabolit sekunder akan tetap berada dalam larutan. Adalah penting dalam mengembangkan suatu uji enzim bahwa toleransi pengujian terhadap konsentrasi DMSO yang berbeda ditentukan.

2.10 Kompatibilitas Ekstrak

Banyak program skrining produk alami akan melibatkan skrining ekstrak dari beberapa sumber yang berbeda termasuk jamur, organisme laut, dan tanaman. Selain itu, beberapa ekstrak kimia yang berbeda juga dapat dibuat untuk setiap organisme tertentu untuk memilih jenis metabolit sekunder tertentu. Jenis ekstrak yang berbeda ini perlu dievaluasi dalam pengujian untuk menentukan konsentrasi optimal untuk dimasukkan dalam skrining. Hal ini dicapai dengan skrining sampel yang relatif besar

dari ekstrak yang berbeda dan menentukan konsentrasi pengujian akhir yang memberikan jumlah senyawa aktif atau hasil pengujian yang diinginkan. Umumnya, tingkat hit yang diinginkan antara 0,1% dan 1%. Kompatibilitas berbagai jenis ekstrak untuk pengujian tertentu sering dikaitkan dengan jenis titik akhir pengujian yang digunakan.

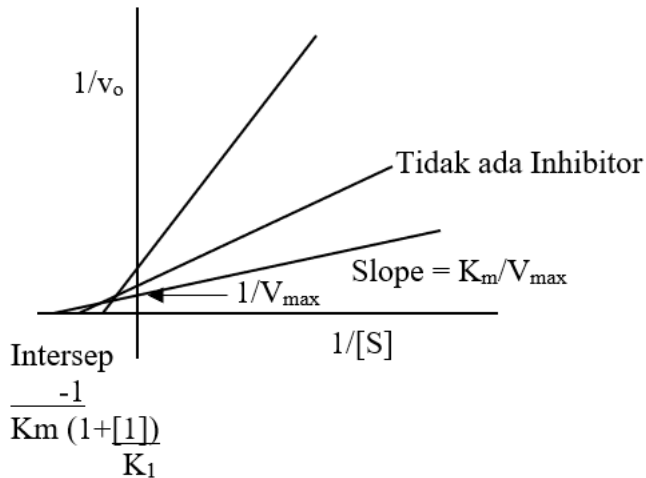
2.11 Profil Inhibitor

Bagian integral dari pengembangan uji enzim untuk identifikasi inhibitor adalah mengevaluasi beberapa inhibitor berbeda dalam pengujian, jika tersedia. Kedua inhibitor nilai K_i dan mekanisme inhibisi dapat ditentukan dan dibandingkan dengan informasi dalam literatur. Meskipun aktivator enzim mungkin menarik, sebagian besar uji enzim dikonfigurasi untuk mengidentifikasi inhibitor enzim. Secara umum ada tiga jenis penghambatan enzim reversibel: kompetitif, tidak kompetitif, dan nonkompetitif. Mekanisme yang berbeda ini dapat dibedakan secara eksperimental dengan mengevaluasi efek peningkatan konsentrasi inhibitor tetap pada enzim V_{maks} dan nilai-nilai K_m . Diskusi berikut menjelaskan bagaimana K_i dan mekanisme penghambatan dapat ditentukan secara eksperimental.

2.12 Penghambatan Kompetitif

Karakteristik utama dari inhibitor kompetitif adalah bahwa ia bersaing dengan substrat untuk mengikat sisi aktif enzim. Inhibisi kompetitif dapat dikurangi dengan meningkatkan konsentrasi substrat. Plot Line weaver-Burke $1/V_o$ vs $1/[S]$ yang dilakukan dengan adanya peningkatan konsentrasi tetap dari inhibitor kompetitif akan menghasilkan peningkatan nilai K_m tanpa mempengaruhi nilai V_{maks} , seperti yang ditunjukkan pada Gambar 6.

Dari hubungan antara struktur inhibitor kompetitif dan kompetisinya untuk pengikatan substrat, informasi penting mengenai sisi aktif enzim seringkali dapat diperoleh.



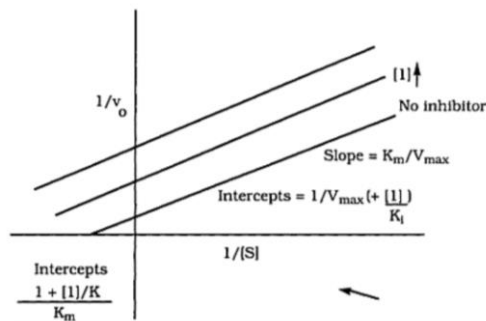
Gambar 6. Plot Lineweaver-Burke inhibitor kompetitif

2.13 Penghambatan Tidak Kompetitif

Selama inhibisi tidak kompetitif, inhibitor tidak berinteraksi dengan enzim bebas tetapi berinteraksi dengan kompleks enzim-substrat untuk menghambat pembentukan produk. Oleh karena itu, K_m dan nilai V_{maks} akan menurun dengan adanya peningkatan inhibitor. Plot data Lineweaver-Burke yang dihasilkan dengan adanya peningkatan konsentrasi inhibitor tidak kompetitif akan memiliki fitur umum yang ditunjukkan pada Gambar 7.

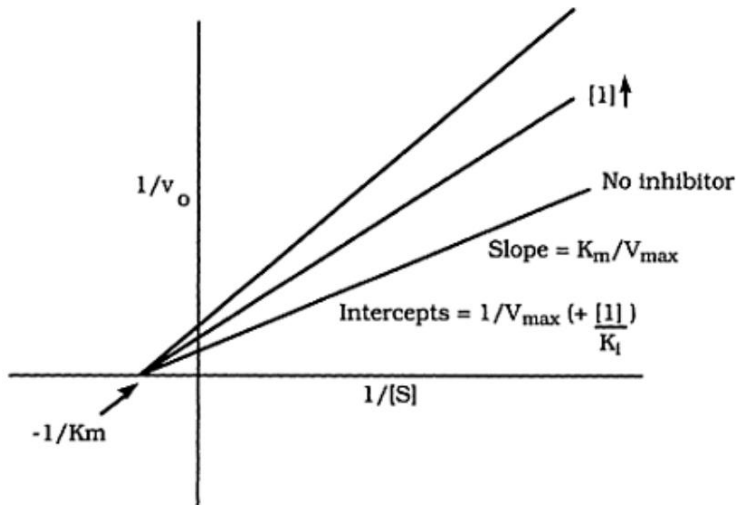
2.14 Penghambatan Nonkompetitif

Inhibitor nonkompetitif dapat berinteraksi dengan enzim bebas atau dengan kompleks enzim substrat. Inhibitor nonkompetitif mengikat ke situs enzim (selain situs aktif) dan mempromosikan perubahan konformasi dalam enzim menghasilkan enzim nonfungsional yang tidak membentuk kompleks substrat-enzim atau yang terurai untuk menghasilkan satu produk pada tingkat yang khas. Penghambatan nonkompetitif umumnya sangat jarang dan dalam banyak kasus disebut sebagai "penghambatan campuran". Plot Lineweaver-Burke (Gambar 8) dari aktivitas dengan adanya peningkatan konsentrasi inhibitor akan menunjukkan penurunan V_{maks} dan tidak ada perubahan nilai K_m . Gambar 8 menunjukkan karakteristik Plot Lineweaver-Burke dari inhibisi nonkompetitif.



Gambar 7. Plot Lineweaver-Burke inhibisi unkompetitif

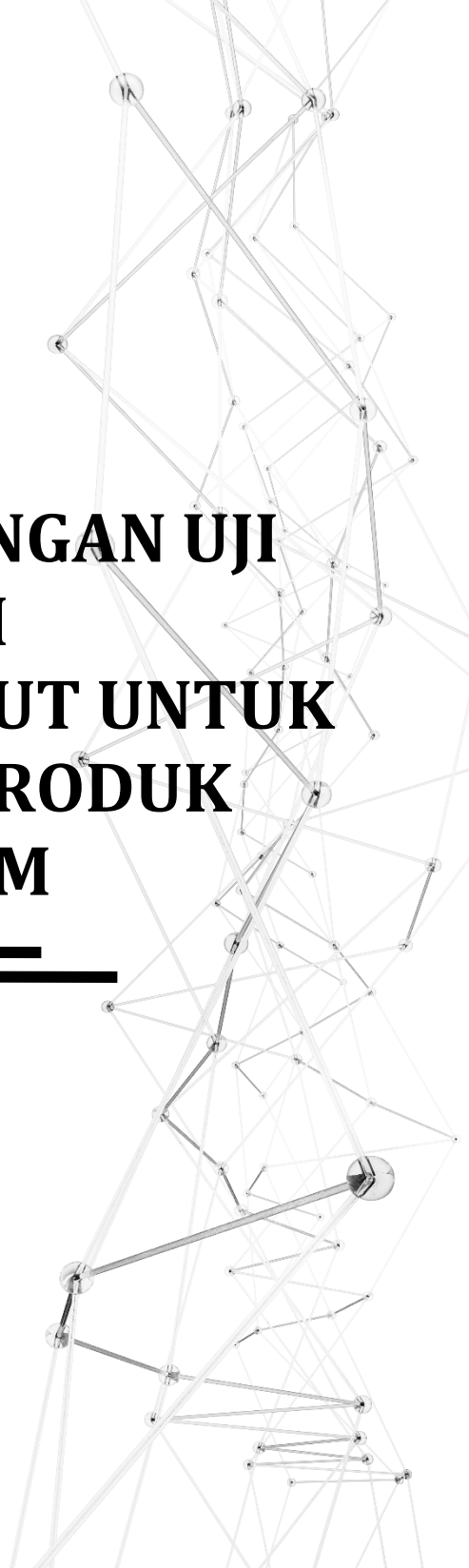
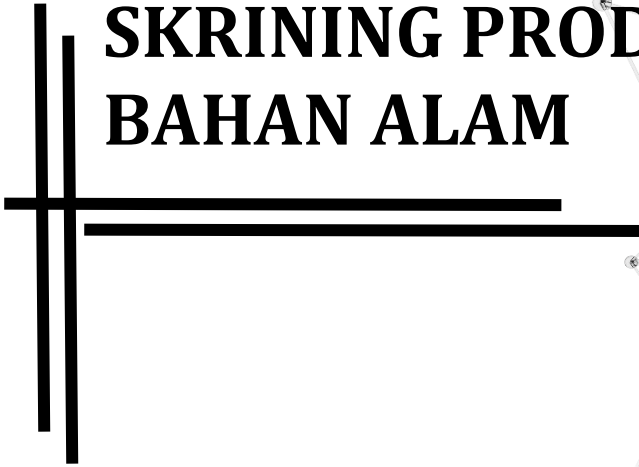
Inhibisi unkompetitif sangat jarang terjadi pada reaksi enzimatik satu substrat dan umumnya terjadi pada reaksi enzim dua substrat.



Gambar 8. Plot Lineweaver-Burke inhibisi nonkompetitif

Dari sudut pandang penemuan obat, inhibitor nonkompetitif tidak akan seperti yang diinginkan sebagai inhibitor kompetitif dan diharapkan lebih nonselektif dan kemungkinan besar dapat menghambat banyak enzim. Hubungan di atas juga berlaku untuk inhibitor reaksi enzim dua substrat. Dalam hal ini, pengaruh peningkatan konsentrasi inhibitor dievaluasi pengaruhnya terhadap hubungan konsentrasi substrat A dan substrat B pada nilai K_m dan V_{maks} yang ditentukan dari plot Lineweaver-Burke.

**BAB III.
PENGEMBANGAN UJI
ENZIM HIGH
THROUGHPUT UNTUK
SKRINING PRODUK
BAHAN ALAM**



Untuk mengilustrasikan beberapa poin di atas yang dibuat mengenai pengembangan uji enzim *High Throughput* untuk skrining produk alami, pengembangan uji enzim untuk *farnesyltransferase* akan disajikan. *Farnesyltransferase* adalah enzim yang mengkatalisis penambahan bagian isoprenoid farnesyl C-15 ke substrat protein spesifik yang memiliki kotak CAAX asam amino terminal-C. Ras adalah salah satu substrat fisiologis untuk *farnesyltransferase* dan modifikasi ini telah terbukti penting untuk transformasi seluler terkait Ras. Beberapa bentuk kanker manusia yang resisten terhadap obat antikanker konvensional, seperti kanker usus besar dan pankreas, mengandung protein Ras bermutasi tingkat tinggi. Karena pengamatan ini, telah dipostulasikan bahwa penghambat farnesyl Ras mungkin merupakan agen antikanker yang berharga. Beberapa penghambat *farnesyltransferase* seperti peptida dan produk alami yang berbeda telah diidentifikasi dalam program skrining dan beberapa di antaranya telah dilaporkan menghambat transformasi sel normal oleh protein Ras mutan.

Farnesyltransferase adalah enzim yang mengandung protein heterodimerik sitosol yang mengandung α - dan β -subunit yang membutuhkan ion seng dan magnesium untuk aktivitas. Subunit α - mengikat *farnesylpyrophosphate* dan digunakan bersama dengan enzim isoprenilasi terkait, *geranylgeranyltransferase*. Subunit β -mengikat substrat. Secara struktural berbeda dari β -subunit *geranylgeranyltransferase* dan

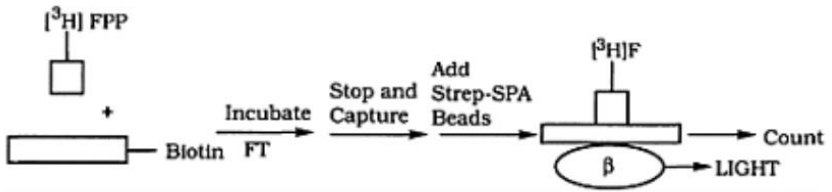
berikatan dengan substrat yang menjadi terisoprenilasi. Uji *farnesyltransferase* dengan demikian merupakan reaksi enzimatik dua substrat yang membutuhkan *farnesylpyrophosphate* dan substrat protein yang mengandung kotak CAAX terminal-N. Studi kinetik rinci telah menunjukkan bahwa ada urutan acak penambahan substrat ke enzim.

Dalam mengonfigurasi pengujian untuk penemuan obat, keputusan perlu dibuat mengenai jenis inhibitor apa yang harus bias diidentifikasi dengan skrining. Inhibitor kompetitif dari pengikatan *farnesylpyrophosphate* tidak diinginkan karena potensi reaksi silang dari inhibitor ini dengan *geranylgeranyltransferase*, yang mengakibatkan kurangnya selektivitas dan kemungkinan efek samping yang parah. Layar yang dirancang untuk mengidentifikasi pesaing inhibitor pengikatan substrat ke subunit β - akan lebih diinginkan karena potensi selektivitas hanya untuk *farnesyltransferase* akan jauh lebih tinggi.

Pertimbangan pertama untuk mengembangkan pengujian adalah untuk mengidentifikasi sumber yang tepat dari enzim *farnesyltransferase*. Otak tikus dipilih karena tidak ada sumber manusia yang cocok untuk diidentifikasi. Namun, plasenta manusia baru-baru ini disarankan sebagai sumber enzim manusia yang baik. Enzim dimurnikan sebagian (50 kali lipat) dengan memasukkan 100.000 x g semut supernat ke pengendapan amonium sulfat dan kromatografi kolom MonoQ dan Sephacel S-200. Persiapan normal menggunakan 50 otak tikus menyediakan

bahan yang cukup untuk sekitar 100 pelat uji. Persiapan ini diperiksa untuk aktivitas *geranylgeranyltransferase* dan tidak ada yang terdeteksi. Studi stabilitas enzim menunjukkan bahwa enzim yang dimurnikan sebagian stabil dengan penyimpanan pada suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama satu bulan. Setelah mengembangkan pengujian ini, sebuah paten diberikan kepada *University of Texas Southwestern Medical Center* yang mencakup isolasi *farnesyltransferase*. Teknologi ini dapat dilisensikan untuk digunakan dalam penemuan obat.

Beberapa uji yang berbeda untuk *farnesyltransferase* dapat dipertimbangkan untuk mengembangkan uji skrining. Yang paling menarik dari sudut pandang *high throughput* adalah kit uji kedekatan kilau *farnesyltransferase* yang tersedia secara komersial dari Amersham. Daya tarik utama dari pengujian ini adalah bahwa langkah pemisahan yang biasanya diperlukan untuk menyelesaikan substrat dan produk dalam metode pengujian radiometrik tipikal tidak diperlukan dalam pengujian SPA. Gambar 9 menunjukkan representasi diagram dari prinsip dan langkah-langkah yang terkait dengan uji SPA.



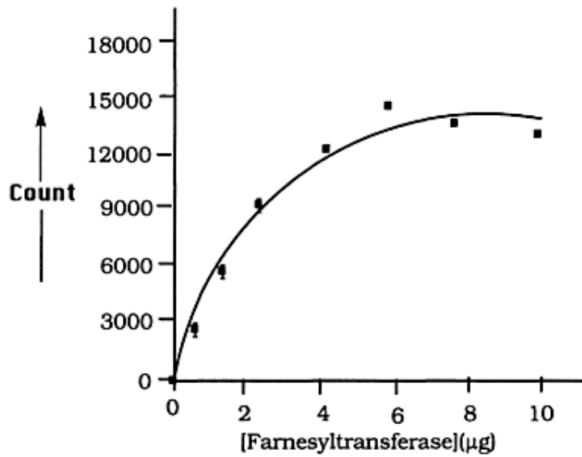
Gambar 9. Prinsip Uji Amersham SPA farnesyltransferase

Prinsip uji SPA adalah bahwa [^3H] farnesyl dimasukkan ke dalam peptida sintetik terbiotinilasi yang sesuai dengan ekor terminal-C dari lamin, substrat fisiologis untuk *farnesyltransferase*. Setelah penggabungan, streptavidin berpasangan ditambahkan ke manik-manik SPA. Berdasarkan interaksi afinitas tinggi streptavidin dan biotin, [^3H]-farnesil yang tergabung ke dalam peptida lamin didekatkan dengan manik SPA yang mengandung *scintillant*. [^3H]- bagian farnesyl tidak berhubungan dan tidak dekat dengan manik-manik SPA, tidak berkontribusi pada sinyal. Langkah-langkah pengujian aktual yang terlibat dalam pengujian SPA adalah sebagai berikut:

1. 50 μl buffer uji, 15 μl 0,5 μM biotinyl-lamin peptide, dan 15 μl 60 μM [^3H]- farnesylpyrophosphate ditambahkan ke pelat mikrotiter. Kontrol negatif juga mengandung 2 μM peptida CVLS.
2. Senyawa uji ditambahkan dalam 10 μl alikuot.
3. Reaksi enzim dimulai dengan penambahan 10 μl enzim (1 μg).

4. Pelat diinkubasi tepat selama 60 menit pada suhu 37°C.
5. Hentikan sebanyak 150 µl buffer yang mengandung manik-manik SPA berlapis streptavidin, ditambahkan ke masing-masing sumur dan pelat, diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang.
6. Pelat kemudian dibaca dalam penghitung kilau pelat mikrotiter.

Uji ini sangat cocok untuk skrining volume tinggi karena hanya dua langkah tambahan yang diperlukan sebelum pembacaan titik akhir. Karena pengujian dalam format pelat mikrotiter, itu dapat menerima manipulasi robot dan dapat sepenuhnya otomatis. Meskipun kit uji yang disediakan oleh Amersham berisi protokol uji, perlu untuk mengoptimalkan pengujian untuk skrining. Langkah pertama dalam pengembangan dan validasi pengujian adalah mengevaluasi hubungan konsentrasi enzim terhadap uji sinyal kebisingan. Percobaan ini dilakukan dengan adanya konsentrasi jenuh [³H]-*farnesylpyrophosphate* dan konsentrasi *biotinyl-lamin* yang sedikit lebih tinggi dari nilai K_m untuk enzim. Data eksperimen menunjukkan bahwa aktivitas tersebut linier hingga 2 µg protein tambahan. Pada 1 µg, sinyal kebisingan adalah 100:1 dan dapat diterima untuk pengujian skrining (Gambar 10).

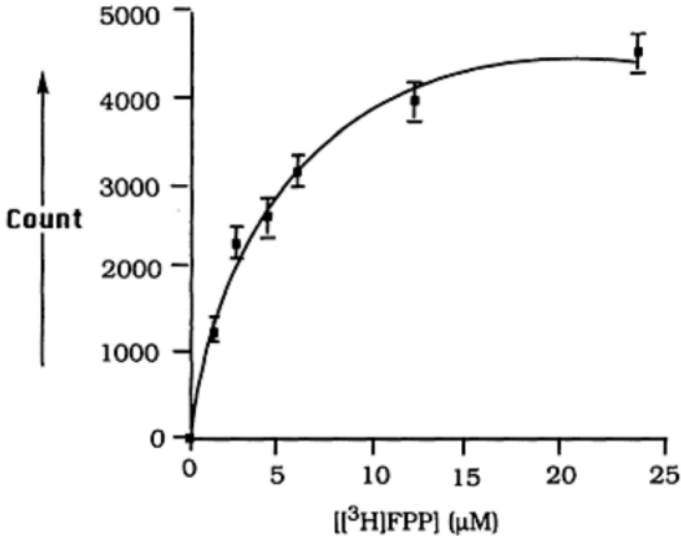


Gambar 10. Penambahan variabel farnesytransferase dalam uji SPA.

Konsentrasi akhir dari 9 mM [^3H]- FPP, 100 nM biotinyl-lamin peptida, dan konsentrasi yang ditunjukkan dari enzim yang dimurnikan sebagian hadir dalam pengujian dan inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Titik data mewakili mean \pm SEM dari penentuan rangkap tiga pada setiap konsentrasi enzim. Data dicocokkan dengan fungsi hiperbolik menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier, Prism.

Percobaan selanjutnya dirancang untuk menentukan nilai K_m untuk [^3H]-farnesylpyrophosphate dan dilakukan dengan adanya konsentrasi jenuh biotinyl-lamin (0,075 μM) dan 1 μg enzim. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa [^3H]-farnesylpyrophosphate memiliki nilai K_m sekitar 2,3 μM (Gambar 11). Keputusan dibuat untuk memasukkan 10 μM konsentrasi akhir [^3H]- farnesylpyrophosphate untuk memastikan bahwa enzim sepenuhnya jenuh sehubungan dengan substrat ini dan lebih bias dalam mendeteksi inhibitor interaksi biotinyl-lamin dengan

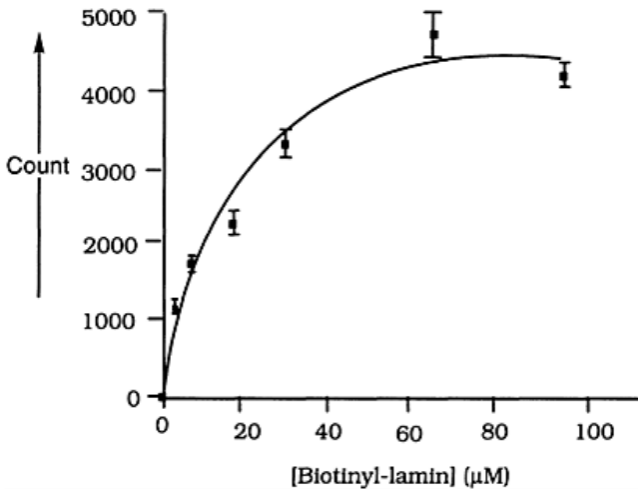
farnesyltransferase.



Gambar 11. Penambahan variabel [³H]-farnesylpyrophosphate dalam uji farnesyltransferase SPA. Konsentrasi akhir Img enzim, 100 nM biotinyl-lamin, dan konsentrasi yang ditunjukkan dari [³H]-farnesylpyrophosphate hadir dalam pengujian; inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Titik data mewakili rata-rata \pm SEM dari penentuan rangkap tiga yang dibuat pada setiap konsentrasi [³H]-FPP. Data dicocokkan dengan fungsi hiperbolik menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier, Prism.

Nilai K_m untuk biotinil-lamin selanjutnya ditentukan dengan adanya konsentrasi jenuh [³H]-farnesylpyrophosphate dan 1 µg enzim (Gambar 12). Sebuah nilai K_m 19 nM ditentukan. Karena sinyal kebisingan yang relatif rendah pada 20 nM, sebuah keputusan dibuat untuk memasukkan 70 nM biotinyl-lamin dalam pengujian untuk mencapai rasio sinyal kebisingan yang tinggi dalam kisaran 100:1.

Evaluasi kursus waktu selanjutnya dilakukan terhadap 10 [³H]-farnesylpyrophosphate, 70 nM biotinyI-lamin, dan 1 µg enzim/sumur (Gambar 13). Hasil evaluasi ini menunjukkan bahwa % [³H]-*farnesylpyrophosphate* yang tergabung meningkat secara linier antara 10 dan 60 menit pada suhu ruang. Masa inkubasi 60 menit pada suhu ruang dipilih untuk pengujian berikutnya. Pada periode waktu ini, inkubasi berada di bawah kondisi laju awal.

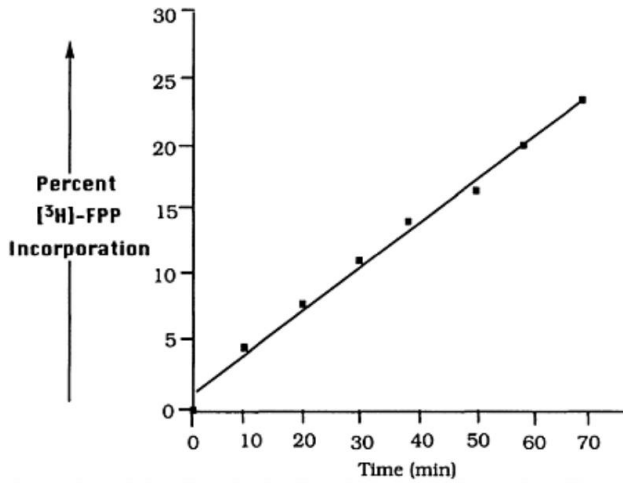


Gambar 12. Penambahan variabel biotinil-lamin dalam uji *farnesyltransferase* SPA. Konsentrasi akhir *Img* enzim, 10 mM [^3H]-FPP, dan konsentrasi biotinil-lamin yang terindikasi hadir; inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Titik data mewakili $\text{mean} \pm \text{SEM}$ dari penentuan rangkap tiga yang dibuat pada masing-masing menunjukkan konsentrasi biotinil-lamin. Data dicocokkan dengan fungsi hiperbolik menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier, Prism.

Selama pengembangan pengujian ini, tidak ada inhibitor yang tersedia secara komersial untuk evaluasi dalam pengujian tersebut. CVSL tetrapeptida, yang sesuai dengan kotak CAAX dari p21- Harvey Ras, digunakan untuk menghambat farnesilasi biotinil-lamin. Karena CVLS adalah substrat untuk *farnesyltransferase*, ia akan bersaing untuk farnesilasi dengan biotinil-lamin. Peptida ini menghambat penggabungan [^3H]-*farnesylpyrophosphate* menjadi *biotinyl-lamin* dengan nilai IC_{50}

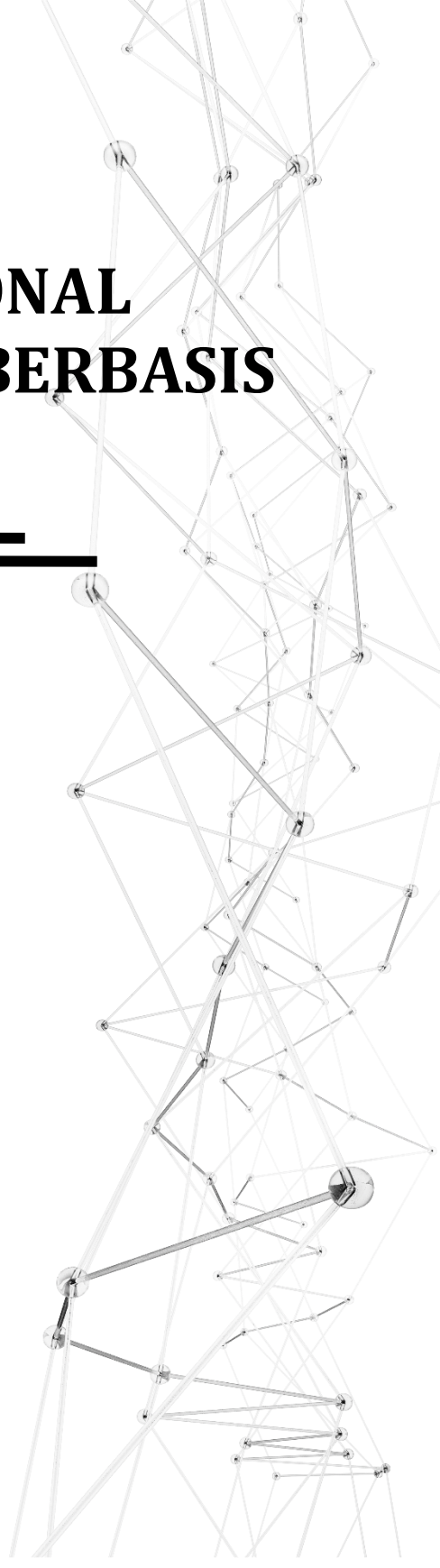
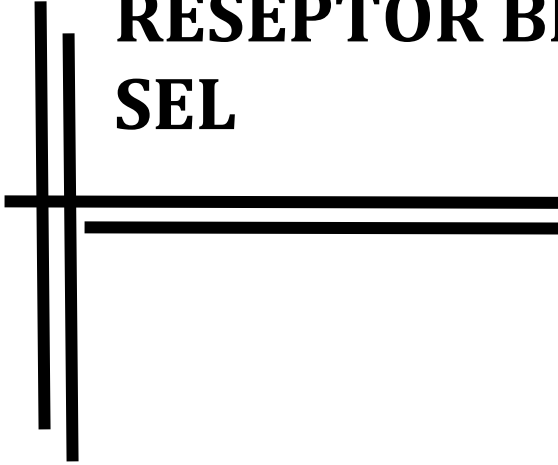
sebesar 796 nM (Gambar14).

Pengaruh DMSO pada aktivitas *farnesyltransferase* selanjutnya dievaluasi untuk menentukan toleransi pengujian untuk DMSO. Aktivitas tidak terpengaruh oleh konsentrasi DMSO hingga 10% dan nilai konsentrasi DMSO akhir ini digunakan dalam uji skrining (data tidak ditampilkan). Beberapa jenis ekstrak etil asetat yang berbeda dievaluasi dalam pengujian untuk menetapkan konsentrasi akhir ekstrak yang akan menghasilkan tingkat hit sekitar 0,5%. Konsentrasi akhir 0,1X (dari ekstrak pekat 10X asli) untuk 200 ekstrak actinomycete darat dan laut yang berbeda dan 200 ekstrak jamur darat dan laut yang berbeda ditemukan untuk menghasilkan tingkat hit uji yang diinginkan. Ekstrak metilen klorida organik, ekstrak etanol dalam air, dan ekstrak etanol dalam air yang dihilangkan polifenolnya dengan kromatografi yang dibuat dari 100 tanaman berbeda juga diuji dalam pengujian. Konsentrasi uji akhir 40 mg/ml untuk ketiga ekstrak tumbuhan yang berbeda memberikan *hit rate* sekitar 0,5%.



Gambar 13. Kursus waktu uji Farnesyltransferase. Pengujian mengandung konsentrasi akhir enzim 1 mg, 10 mM $[^3\text{H}]$ -FPP, dan 70 nM biotinil-lamin dan inkubasi dilakukan untuk periode yang ditunjukkan pada suhu ruang. Penentuan rangkap tiga dilakukan pada setiap titik waktu, rata-rata dihitung, dan persentase penambahan $[^3\text{H}]$ -FPP yang dimasukkan ke dalam substrat ditunjukkan. Garis yang ditarik mewakili regresi linier data menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier, Prism

BAB IV.
UJI FUNGSIONAL
RESEPTOR BERBASIS
SEL



Ligan endogen atau agonis sintetik yang mengikat sitokin spesifik, faktor pertumbuhan, hormon, dan reseptor neurotransmitter adalah langkah pertama dalam jalur transduksi sinyal kompleks yang pada akhirnya mengarah pada pembentukan respons fisiologis yang ditentukan. Jalur pensinyalan biasanya melibatkan beberapa molekul transduksi sinyal yang berbeda dan umumnya digunakan bersama oleh reseptor yang terkait secara struktural. Berbeda dengan pengikatan agonis, pengikatan antagonis pada reseptor tidak mengaktifkan jalur transduksi sinyal reseptor. Oleh karena itu, antagonis tidak menyebabkan respons seluler. Namun, antagonis akan memblokir respon ligan agonis endogen. Meskipun uji pengikatan radioligand memberikan informasi tentang pengikatan ligan ke reseptor, jenis pengujian ini tidak memberikan informasi mengenai apakah ligan reseptor adalah agonis atau antagonis. Tersedia pengujian yang melibatkan pengukuran beberapa aspek aktivasi yang dimediasi reseptor dari jalur transduksi sinyal reseptor dan dengan demikian dapat berfungsi sebagai pengujian fungsional yang dapat digunakan untuk membedakan agonis dan antagonis reseptor.

Uji reseptor fungsional dengan cepat menggantikan uji pengikatan radioligand, karena uji ini lebih murah dan sederhana untuk dilakukan. Salah satu alasan utama bahwa uji reseptor fungsional menjadi lebih populer sebagai uji skrining utama adalah karena telah disederhanakan dan dikonfigurasi ke dalam format pelat mikrotiter 96-sumur untuk skrining *high throughput* dari sejumlah besar ekstrak.

4.1 Uji Fungsional untuk Reseptor G-protein Berpasangan

Jalur Transduksi Sinyal Reseptor Gabungan Gs dan Gi

Cara kerja agonis dari beberapa reseptor berbeda dari tujuh transmembran superfamili reseptor (7-TM) atau reseptor berpasangan G-protein (GPCR), menghasilkan baik meningkatkan atau menurunkan konsentrasi kedua intraseluler penting, cAMP (Tabel 3). Respon yang diperantarai reseptor ini disebabkan oleh stimulasi yang diperantarai protein-G atau penghambatan enzim adenilil siklase. Peningkatan cAMP pada gilirannya menyebabkan aktivasi protein serin/treonin spesifik kinase, protein kinase yang bergantung pada cAMP atau protein kinase A (PKA). Mayoritas respons fisiologis yang dimediasi oleh reseptor berpasangan adenilat siklase melibatkan peningkatan atau penurunan fosforilasi substrat protein spesifik yang dimediasi PKA. Tingkat seluler cAMP yang dibentuk oleh adenilat siklase dikontrol ketat

oleh aksi isozim fosfodiesterase yang mengkatalisis konversi cAMP menjadi AMP (Gambar 15.). Mekanisme dimana hormon atau neurotransmitter meningkatkan kadar cAMP seluler telah dikarakterisasi dengan baik dan dijelaskan di bawah ini:

Pengikatan agonis pada reseptor perspektifnya mengarah pada penggabungan kompleks reseptor agonis dengan protein pengikat nukleotida guanin heterotrimerik (protein G), Gs. Kompleks terner yang terbentuk antara reseptor agonis dan Gs merupakan konformasi pengikatan agonis afinitas tinggi dari reseptor sedangkan reseptor yang tidak terkait dengan Gs merupakan konformasi pengikatan agonis afinitas rendah. Pembentukan kompleks terner menghasilkan pelepasan GDP terikat dari Gs yang tidak aktif, pengikatan GTP berikutnya yang mengarah ke aktivasi Gs. Aktivasi Gs dipostulatkan untuk melibatkan disosiasi Gs ke dalam konstitutifnya α_s -GTP dan subunit $\beta\gamma$ yang bertindak untuk mengaktifkan adenilat siklase. Aktivasi adenilat siklase oleh protein Gs diakhiri dengan hidrolisis GTP menjadi GDP (disebut sebagai reaksi GTPase) diikuti dengan reasosiasi subunit Gs. Uji skrining yang dirancang untuk mencari agonis reseptor Gs berpasangan melibatkan senyawa pengujian untuk stimulasi aktivitas adenilat siklase basal. Skrining yang dirancang untuk mengidentifikasi antagonis reseptor Gs berpasangan melibatkan skrining untuk senyawa yang menurunkan stimulasi adenilat siklase yang dimediasi agonis.

Penghambatan adenilil siklase yang dimediasi reseptor memiliki banyak kesamaan dengan stimulasi. Pengikatan agonis pada reseptor mendorong penggabungan dengan protein G spesifik, G_i , yang menyebabkan pelepasan PDB, pengikatan GTP, disosiasi subunit G_i , dan penghambatan adenilil siklase oleh subunit G_i . Seperti halnya G_s , G_i mengalami reaksi GTPase yang menghasilkan reformasi G_i yang terikat PDB trimerik yang tidak aktif. Pengujian yang dirancang untuk mengidentifikasi agonis reseptor G_i berpasangan biasanya dirancang untuk mengidentifikasi senyawa yang menghambat aktivitas adenilil siklase yang distimulasi forskolin. Identifikasi antagonis reseptor G_i dilakukan dengan kemampuan skrining senyawa untuk mengurangi penghambatan aktivitas adenilil siklase yang distimulasi oleh agonis yang dimediasi oleh forskolin.

Tabel 3. Reseptor Gabungan Gs dan Gi

Reseptor	Pasangan	Reseptor	Pasangan	Reseptor	Pasangan
Adenosin A ₁	Gi	Melatonin ML _{1A}	Gi	Prostanoid EP ₄	Gs
Adenosin A _{2A}	Gs	Melatonin ML _{1B}	Gi	Purinoseptor P _{2T}	Gi
Adenosin A _{2B}	Gs	Metabotropik mGlu ₂	Gi	Secretin	Gs
Adenosin A ₃	Gi	Metabotropik mGlu ₃	Gi	Serotonin 5HT _{1A}	Gi
Adrenergik A _{2A}	Gi	Metabotropik mGlu ₄	Gi	Serotonin 5HT _{1B}	Gi
Adrenergik A _{2B}	Gi	Metabotropik mGlu ₆	Gi	Serotonin 5HT _{1D}	Gi
Adrenergik A _{2C}	Gi	Metabotropik mGlu ₇	Gi	Serotonin 5HT _{1E}	Gi
Adrenergik B ₁	Gs	Metabotropik mGlu ₈	Gi	Serotonin 5HT _{1F}	Gi
Adrenergik B ₂	Gs	Muscarinic M ₂	Gi	Serotonin 5HT ₄	Gs
Adrenergik B ₃	Gs	Muscarinic M ₄	Gi	Serotonin 5HT ₆	Gs
Adrenomedulin	Gs	Neuropeptida Y ₁	Gi	Serotonin 5HT ₇	Gs
CGRP	Gs	Neuropeptida Y ₂	Gi	Somatostain SST ₁	Gi

Reseptor	Pasangan	Reseptor	Pasangan	Reseptor	Pasangan
Cannabinoid CB ₁	Gi	Neuropeptida PP ₁	Gi	Somatostain SST ₂	Gi
Dopamin D ₁	Gs	Opioid m	Gi	Somatostatin SST ₃	Gi
Dopamin D ₂	Gi	Opioid d	Gi	Somatostatin SST ₄	Gi
Dopamin D ₃	Gi	Opioid k	Gi	Somatostatin SST ₅	Gi
Dopamin D ₄	Gi	PACAP	Gs	Vasopressin V ₂	Gs
Dopamin D ₅	Gs	Prostanoid DP	Gs	VIP ₁	Gs
GABAB	Gi	Prostanoid IP	Gs	VIP ₂	Gs
Galanin	Gi	Prostanoid EP ₂	Gs		
Histamin H ₂	Gs	Prostanoid EP ₃	Gi		

Pengujian Fungsional *High Throughput* untuk Reseptor Gabungan Gs-dan Gi-

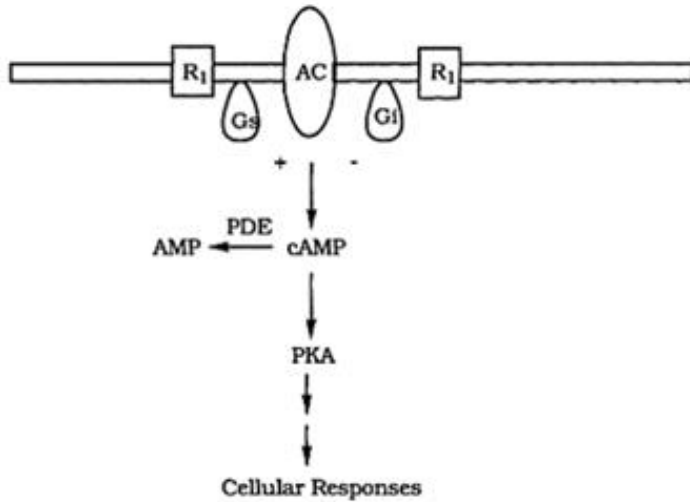
Beberapa metodologi pengujian yang tersedia secara komersial telah dikembangkan untuk mengukur kadar cAMP atau aktivitas adenilil siklase yang tidak melibatkan langkah-langkah kromatografi yang melelahkan yang biasanya diperlukan untuk

menyelesaikan substrat dan produk (ATP dan cAMP). Pengujian baru ini umumnya dapat digunakan dalam skrining *high throughput*. Bagian berikut menjelaskan beberapa sistem pengujian baru ini.

4.2 Uji Fungsional Reseptor Berbasis Sel Umum

SPA cAMP Assay

Amersham telah mengembangkan kit *scintillation proximity assay* (SPA) yang tersedia secara umum yang dapat digunakan untuk pengukuran cAMP. Baik sel utuh atau membran plasma yang mengandung reseptor yang diinginkan dapat digunakan. Keunggulan pengujian ini adalah bahwa langkah pemisahan dan pencucian untuk metode pengukuran tradisional tidak diperlukan sehingga menghasilkan peningkatan besar dalam hasil pengujian. Komponen penting dari sistem uji cAMP SPA termasuk penggunaan antibodi primer anti-cAMP dan antibodi sekunder yang digabungkan dengan manik-manik SPA. Prinsip pengujian adalah bahwa jejak [¹²⁵I] cAMP yang ditambahkan ke campuran reaksi uji akan bersaing dengan cAMP yang dihasilkan dalam uji untuk mengikat antibodi primer. Manik SPA dibawa mendekat dari [¹²⁵I] cAMP melalui antibodi sekunder. Saat cAMP meningkat, sinyal dalam pengujian menurun.



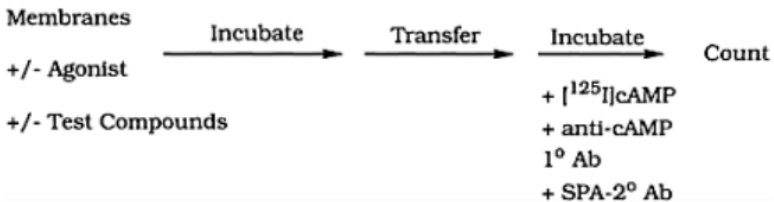
Gambar 15. Regulasi tingkat cAMP seluler yang dimediasi reseptor

Langkah-langkah yang terlibat dalam uji cAMP Amersham adalah sebagai berikut:

1. Sel atau membran, agonis jika diinginkan, dan ekstrak uji ditambahkan ke pelat microtiter standar dan diinkubasi selama periode yang telah ditentukan pada suhu ruang.
2. Pelat mikrotiter kemudian disentrifugasi dan alikuot dikeluarkan dan ditempatkan pada pelat mikrotiter lain, bersama dengan standar dan dapar untuk sumur kosong. Dimungkinkan untuk melakukan uji cAMP awal dan penentuan cAMP di plat yang sama jika jumlah membran atau sel yang digunakan sedikit dan jika tingkat cAMP yang dihasilkan dalam inkubasi awal cukup untuk masuk

dalam kurva standar. Jika sel digunakan, mereka perlu dilisiskan dahulu sebelum melakukan sentrifugasi pelat.

3. Setelah transfer aliquot dari campuran reaksi ke pelat mikrotiter, pelacak [125 I] cAMP, antibodi anti-cAMP, dan konjugat antibodi sekunder anti-kelinci SPA adalah ditambahkan, dan piring diinkubasi selama 15-20 jam pada suhu ruang.
4. Pelat kemudian dihitung dalam plat mikrotiter *scintillation counter*. Nilai cAMP dalam sampel eksperimental ditentukan dengan ekstrapolasi dari kurva standar cAMP yang dihasilkan. Biasanya, kurva standar dihasilkan dari setiap pelat uji. Komponen dan langkah-langkah pengujian SPA-cAMP tercantum pada Gambar 16.



Gambar 16. Langkah-langkah yang terlibat dalam uji SPA-cAMP

Peralatan berikut akan diperlukan untuk pengujian cAMP SPA *high throughput*:

- Perangkat penanganan cairan pelat 96-sumur (opsional)
- Hitung kilau pelat mikrotiter (*Wallac MicroBeta* atau *Packard Top Count*)
- Sistem robotika untuk manipulasi pelat (opsional)

4.3 Uji cAMP *FlashPlate*

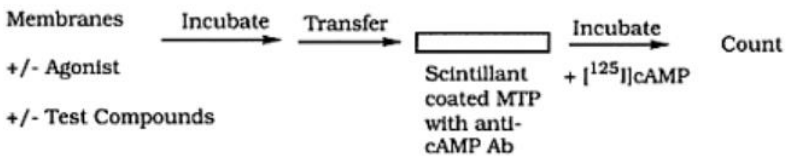
Dupont-NEN telah mengadaptasi teknologi *FlashPlate*TM untuk digunakan sebagai metode pengujian *high throughput* untuk pengukuran level cAMP. Prinsip dasar pengujian adalah kompetisi jejak [¹²⁵I] cAMP ditambahkan dan cAMP dihasilkan selama inkubasi untuk mengikat antibodi anti-cAMP yang ditempelkan pada sumur pelat mikrotiter berlapis *scintillant*. Keuntungan utama dari metode pengujian ini, seperti pengujian SPA, adalah bahwa pemisahan ikatan dari radio pelacak bebas berlabel cAMP tidak diperlukan.

Langkah-langkah yang terlibat dalam uji cAMP *FlashPlate*TM adalah sebagai berikut:

1. Sel atau membran, agonis jika diinginkan, dan ekstrak uji ditambahkan ke pelat mikrotiter dan diinkubasi selama periode yang telah ditentukan pada suhu ruang.
2. Pelat kemudian disentrifugasi, sebagian campuran reaksi dikeluarkan dan ditempatkan di *FlashPlate*. Dimungkinkan

untuk melakukan pengujian generasi cAMP awal dan pengukuran cAMP baik di *FlashPlates* jika jumlah membran yang ditambahkan tidak terlalu mahal dan jika tingkat cAMP yang dihasilkan berada dalam kurva cAMP standar. Jika sel digunakan, mereka perlu dilisiskan sebelum disentrifugasi.

3. Standar acuan cAMP diikuti oleh alikuot dari campuran reaksi ditambahkan ke sumur yang sesuai. Pelacak cAMP kemudian ditambahkan dan pelat diinkubasi selama 18-24 jam pada 2-8°C.
4. Pelat kemudian dibaca dalam *scintillation counter* plat mikrotiter. Konsentrasi cAMP diekstrapolasi dari kurva standar. Gambar 17 menjelaskan komponen dan langkah-langkah yang terkait dengan uji cAMP *FlashPlate*.



Gambar 17. Langkah-langkah yang terlibat dalam uji *FlashPlate* untuk cAMP

Peralatan berikut akan diperlukan untuk melakukan uji cAMP *FlashPlate high throughput*:

- Perangkat penanganan cairan pelat 96-sumur (opsional)
- Penghitung kilau pelat mikrotiter (Hanya *Packard Top Count*)
- Sistem robotika untuk manipulasi pelat (opsional)

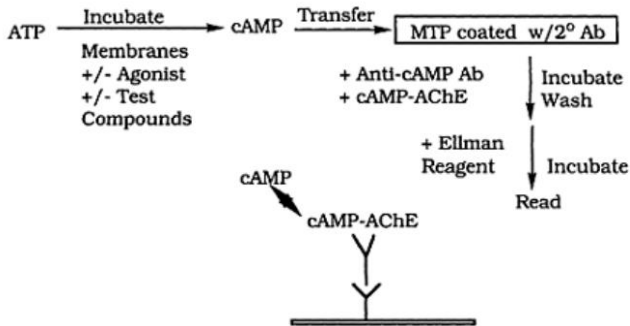
Pengujian cAMP Berbasis ELISA

Cayman Chemical telah mengembangkan kit immunoassay enzim yang kompetitif untuk pengukuran kadar cAMP. Prinsip dasar dari pengujian ini adalah kompetisi antara cAMP yang dihasilkan dan [¹²⁵I] cAMP *tracer* (yang terkait dengan molekul asetilkolinesterase) untuk sejumlah batas situs pengikatan antiserum kelinci spesifik cAMP. Antibodi sekunder, antibodi anti-kelinci monoklonal tikus, sebelumnya melekat pada sumur di pelat mikrotiter. Langkah-langkah berikut terlibat dalam uji cAMP Cayman:

1. Sel atau membran, agonis jika diinginkan, dan ekstrak uji ditambahkan ke pelat mikrotiter dan diinkubasi untuk waktu yang telah ditentukan pada suhu ruang.
2. Jika inkubasi cAMP dilakukan di pelat terpisah, pelat disentrifugasi dan alikuot campuran inkubasi uji dipindahkan (dan diencerkan ke tingkat di mana nilai eksperimental berada dalam kurva standar) ke dalam pelat penentuan cAMP. Dimungkinkan untuk melakukan uji

inkubasi di pelat penentuan cAMP jika konsentrasi membran yang ditambahkan tidak terlalu tinggi dan jika cAMP yang dihasilkan tidak memerlukan pengenceran.

3. Standar referensi cAMP ditambahkan ke sumur yang sesuai. Aliquot dari campuran reaksi inkubasi ditambahkan ke sumur yang sesuai.
4. Aliquot konjugat cAMP-AChE dan larutan antibodi primer kemudian ditambahkan ke plat diikuti dengan inkubasi 18 jam pada suhu ruang.
5. Pelat kemudian dicuci lima kali, reagen Ellman ditambahkan, dan pelat diinkubasi dalam gelap selama 60-90 menit sebelum membaca pelat pada 412nm.



Gambar 18. Langkah-langkah yang terkait dengan uji cAMP berbasis ELISA Cayman.

Produk reaksi enzimatis adalah warna kuning yang dapat dibaca oleh pembaca pelat pada 412 nm. Intensitas warna sebanding dengan konsentrasi cAMP yang ada di dalam sumur. Sensitivitas pengujian turun menjadi 10 pmol/ml tanpa asetilasi. Konsentrasi cAMP dalam sampel uji ditentukan dengan ekstrapolasi dari kurva standar. Langkah-langkah pengujian yang terkait dengan pengujian Cayman RIA diilustrasikan pada Gambar 18.

Peralatan standar yang diperlukan untuk melakukan uji Cayman adalah:

- Perangkat penanganan cairan pelat 96-sumur (opsional)
- Pembaca pelat microtiter
- Pencuci plate microtiter
- sistem robot untuk manipulasi pelat (opsional)

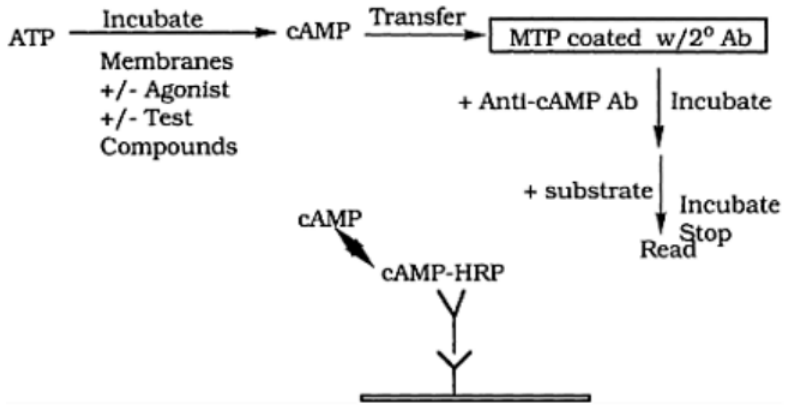
Amersham juga menawarkan kit uji kolorimetri berbasis ELISA nonradioaktif untuk pengukuran level cAMP. Komponen utama kit ini adalah pelat mikrotiter yang dilapisi dengan antibodi sekunder anti-kelinci keledai, antibodi anti-cAMP kelinci, dan cAMP pelacak yang terkonjugasi dengan peroksidase. cAMP yang dihasilkan dalam pengujian akan bersaing untuk mengikat konjugat cAMP-peroksidase ke antibodi primer. Uji ini memiliki sensitivitas 38 pmol/ml menggunakan standar tanpa asetilasi dan 14 pmol/ml menggunakan standar asetat..

Langkah-langkah yang terlibat dalam uji cAMP kolorimetri Amersham adalah sebagai berikut:

1. Sel atau membran, agonis jika diinginkan, dan ekstrak uji ditambahkan ke pelat mikrotiter diikuti dengan inkubasi untuk jangka waktu yang telah ditentukan.
2. Pelat mikrotiter kemudian disentrifugasi, dan sebagian campuran reaksi ditambahkan ke pelat penentuan cAMP yang mengandung antibodi sekunder. Dimungkinkan untuk melakukan inkubasi dan penentuan cAMP di plat yang sama jika sejumlah kecil membran digunakan dan jumlah cAMP yang dihasilkan berada dalam kurva standar cAMP.
3. Setelah transfer sampel eksperimental dan penambahan standar dan buffer ke sumur
kosong, antibodi primer anti-cAMP primer ditambahkan, dan pelat diinkubasi selama 2 jam pada suhu 3–5°C.
4. Konjugat cAMP-peroksidase kemudian ditambahkan ke pelat dan pelat diinkubasi pada suhu 3-5°C selama 60 menit.
5. Plate kemudian dicuci, ditambahkan substrat enzim, dan plate diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang.
6. Reaksi kemudian dihentikan dengan penambahan asam sulfat dan pelat dibaca pada 450 nm dalam waktu 30 menit. Tingkat cAMP dalam sampel eksperimental ditentukan oleh

ekstrapolasi dari kurva standar cAMP.

Gambar 19 menjelaskan langkah-langkah yang terlibat dalam uji cAMP Amersham EIA.



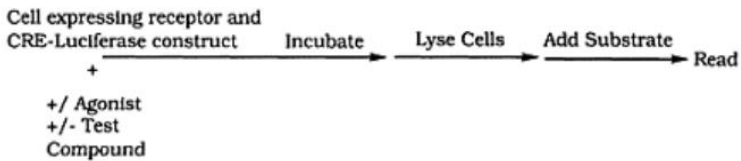
Gambar 19. Langkah-langkah yang terkait dengan uji cAMP berbasis ELISA Amersham.

4.4 Uji Reporter Elemen Gen Respon cAMP

Teknik biologi molekuler telah digunakan untuk mengembangkan uji gen reporter berbasis sel homogen yang dikaitkan dengan generasi cAMP yang dimediasi reseptor. Secara khusus, peningkatan tingkat cAMP seluler mempromosikan aktivasi PKA, fosforilasi elemen cAMP respon, peningkatan pengikatan faktor transkripsi CREB, dan peningkatan transkripsi gen reporter pilihan. Gen reporter umum termasuk β -galaktosidase dan luciferase. Plasmid yang mengandung cAMP *response element* (CRE) dan gen reporter luciferase telah dibuat dan ditransaksikan ke dalam sel yang mengandung Gs atau reseptor terkait Gi yang menarik. Atau, baik reseptor dan struktur CRE-luciferase dapat ditransfusikan bersama ke dalam sel mamalia yang diminati seperti sel CHO, 293, HK, dan 3T3.

Sejumlah perusahaan farmasi telah memanfaatkan teknologi ini untuk pengembangan uji skrining *high throughput*. Uji ini memberikan contoh yang sangat baik tentang bagaimana biologi molekuler dapat digunakan untuk mengembangkan uji skrining reseptor fungsional homogen yang kuat dan sensitif. Meskipun persiapan konstruksi plasmid dan mengoptimalkan tingkat ekspresi cukup melelahkan. Setelah dikembangkan, pengujian ini berfungsi sebagai panduan yang sangat baik. Satu masalah sebelumnya dengan uji luciferase menyangkut sinyal

pendaran yang berumur pendek. Dengan sinyal berumur pendek, tidak mungkin untuk memulai dan membaca keseluruhan pelat mikrotiter karena luminometer membaca satu baris pada satu waktu. Substrat luciferase baru yang menghasilkan sinyal luminescent berumur panjang telah dikembangkan untuk mengatasi masalah ini. Kemajuan lainnya adalah perkembangan *plate reader* yang dapat membaca semua sumur secara bersamaan. Pembicaraan silang optik dapat menjadi masalah yang signifikan dalam uji luciferase dan dapat dikurangi dengan menggunakan pelat mikrotiter khusus. Gambar 20 menjelaskan langkah-langkah yang terkait dengan uji reporter luciferase CRE.



Gambar 20. Langkah-langkah yang terkait dengan uji gen reporter CRE-luciferase.

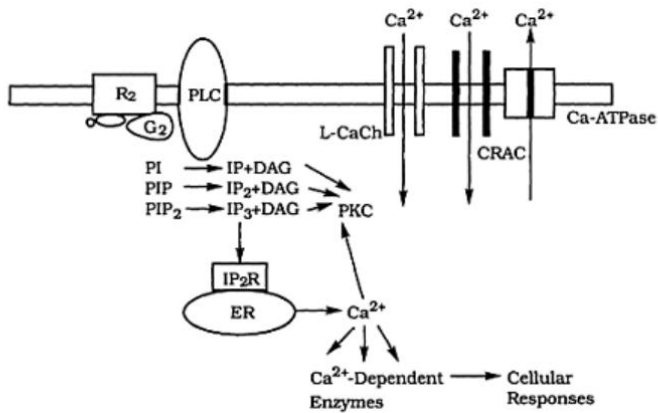
4.5 Jalur Transduksi Sinyal Reseptor Gq Berpasangan

Banyak reseptor berpasangan G-protein mamalia yang berbeda memanfaatkan 1,4,5-inositol triphosphate (IP₃)/diasilgliserol (DAG)/jalur transduksi sinyal kalsium. Langkah pertama dalam jalur pensinyalan ini melibatkan pengikatan agonis ke reseptor yang mengarah ke kopling dengan protein G heterotrimerik spesifik, Gq dan mungkin G₁₁. Pembentukan kompleks terner afinitas tinggi ini kemudian mengarah pada pelepasan GDP terikat protein G dan pertukaran GTP, disosiasi protein G menjadi subunit α dan $\beta\gamma$ yang terikat GTP, dan aktivasi fosfolipase C (PLC) spesifik PI. Bukti eksperimental menunjukkan bahwa isozim PLC diaktifkan oleh subunit protein G.

Selanjutnya, terlihat bahwa subunit- α Gq mengaktifkan PLC β land PLC β 3 sedangkan Gi $\beta\gamma$ merangsang isoform PLC β 2. Aktivasi subunit Gq dari PLC β diakhiri dengan hidrolisis GTP yang terikat pada subunit ke GDP, yang pada gilirannya menyebabkan reasosiasi subunit protein G. Stimulasi PLC β yang dimediasi protein-G menghasilkan hidrolisis spesies fosfatidilinositol terkait membran (fosfatidilinositol, fosfatidil-4-fosfat, dan fosfatidil -4,5-bifosfat) yang menghasilkan pembentukan spesies inositol fosfat (inositol-1-fosfat, inositol -1,4-difosfat, dan inositol-1,4,5-trifosfat) dan diasilgliserol (DAG).

Inositol-1,4,5-trifosfat (IP_3) yang terbentuk kemudian berikatan dengan reseptor IP_3 tertentu yang terletak pada membran retikulum endoplasma menghasilkan pelepasan simpanan kalsium intraseluler. Peningkatan kalsium intraseluler yang diperantarai reseptor ini bersifat sementara dan kembali ke tingkat basal dalam waktu sekitar 10-30 detik. Di banyak sel, penipisan cadangan kalsium intraseluler pada gilirannya mengaktifkan saluran kalsium kapasitansi (juga dikenal sebagai CRAC) yang memungkinkan masuknya kalsium ekstraseluler menghasilkan peningkatan kalsium intraseluler yang lebih berkelanjutan.

Aktivasi saluran kalsium tipe-L yang bergantung pada voltase dalam sel tertentu juga dapat menyebabkan masuknya kalsium ekstraseluler dan berkontribusi pada peningkatan kalsium intraseluler. Kombinasi peningkatan DAG intraseluler dan kalsium menyebabkan aktivasi protein kinase C (PKC) dan fosforilasi substrat seluler spesifik serta aktivasi sejumlah enzim yang bergantung pada kalsium. Tingkat kalsium intraseluler dikembalikan ke tingkat basal oleh aksi gabungan kalsium-ATPase dan Na^+/Ca^{2+} antiporter. Gambar 21 memberikan representasi diagram komponen seluler yang terlibat dalam stimulasi PLC yang dimediasi reseptor dan peningkatan kalsium intraseluler.



Gambar 21. Regulasi kalsium intraseluler yang dimediasi reseptor

Ada sejumlah besar reseptor protein G berpasangan yang mengaktifkan PLC dan mendorong peningkatan kalsium intraseluler. Tabel 4 mencantumkan beberapa reseptor Gq berpasangan yang representatif.

Tabel 4. Reseptor Gq Berpasangan yang Memediasi Peningkatan Kalsium Intraseluler

Adrenergic α 1A	Chemokine CC CK1	Interleukin 8 IL-8B
Adrenergic α 1B		Leukotriene B4
Adrenergic α 1D	Chemokine CC CK2	Leukotriene C4
Angiotensin AT1	Chemokine CC CK3	Leukotriene D4
Bombesin BB1	Cholesystekinin CCKA	Melatonin ML2
Bombesin BB2	Cholesystekinin CCKB	Metabotropic mGlu1
Bombesin BB3	Endothelin ETA	Metabotropic mGlu5
Bradykinin B1	Endothelin ETB	MuscarinicM1
Bradykinin B2	Histamine H1	Muscarinic M3
	Interleukin 8 IL-8A	Muscarinic M5
MCPI	Prostanoid EP3	Tachykinin NK2
Neurotensin	Purinoreceptor P2	Tachykinin NK4
Oxytocin OT	Purinoreceptor P2U	Thrombin
PAF	Serotonin 5HT2A	Vassopressin V1A
Prostanoid FP	Serotonin 5HT2B	Vassopressin V1B
Prostanoid TP	Serotonin 5HT2C	
Prostanoid EP1	Tachykinin NK1	

Selain reseptor Gq berpasangan, beberapa reseptor yang berpasangan dengan Gi telah dilaporkan mengubah kadar kalsium intraseluler. Reseptor ini, melalui mekanisme yang bergantung pada protein G, mengurangi atau menghambat arus kalsium dalam sel tertentu. Daftar reseptor ini ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Reseptor Gq Gabungan Non Protein-G Yang Memediasi Pengurangan Kalsium Intraseluler

Adenosine A1
Adrenergic α 2A
Adrenergic α 2B
Cannabinoid CB1
Cannabinoid CB2
Dopamine D2
Dopamine D3
GABAB
Galanin
Neuropeptide Y2
Opioid m
Opioid d
Opioid k

4.6 Pengujian *High Throughput* Untuk Reseptor Gq berpasangan

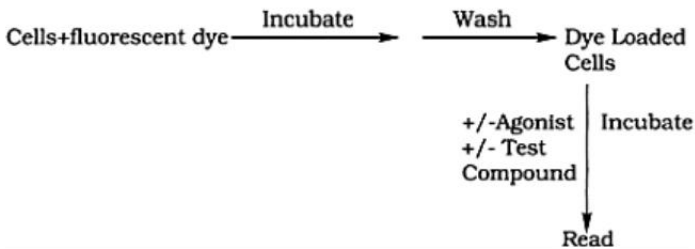
Pengukuran peningkatan yang dimediasi agonis dalam konsentrasi IP₃, DAG, atau kalsium intraseluler dapat berfungsi sebagai uji fungsional untuk reseptor berpasangan Gq. Meskipun kit uji tersedia untuk pengukuran IP₃ dan DAG, uji ini tidak dapat menerima skrining hasil yang tinggi karena melibatkan ekstraksi sel dengan pelarut organik yang sulit. Uji perubahan yang dimediasi reseptor dalam kalsium intraseluler lebih cocok untuk pengembangan uji skrining reseptor fungsional *high throughput*. Ada dua pendekatan yang dapat diambil untuk mengukur perubahan kalsium intraseluler. Salah satu metode terdiri dari mengukur masuknya reseptor-dimediasi dari [⁴⁵Ca²⁺] ke dalam sel yang sesuai yang mengandung reseptor yang diinginkan. Meskipun metode pengujian ini telah digunakan untuk studi reseptor, metode ini tidak cocok untuk skrining hasil yang tinggi karena beberapa alasan.

Pertama, aktivasi reseptor harus menghasilkan masuknya ion kalsium yang signifikan selain pelepasan simpanan intraseluler. Kedua, rasio sinyal kebisingan yang terkait dengan uji fluks ion radioaktif umumnya buruk. Ketiga, metode ini membutuhkan sel-sel yang melekat karena tidak tergabung [⁴⁵Ca²⁺] sehingga perlu dihilangkan dengan mencuci sel. Karena pertimbangan ini, metode pengujian ini umumnya tidak cocok

untuk skrining hasil tinggi. Metode lain untuk mengukur perubahan kalsium intraseluler melibatkan penggunaan pewarna fluoresen sensitif kalsium. Sejumlah pewarna berbeda telah dikembangkan yang sensitive terhadap perubahan nanomolar rendah dalam kalsium intraseluler dan termasuk Fura-2 AM, Fluor-3 AM, Indo 1 AM, dan *Calcium Green* AM. Salah satu fitur penting dari pewarna ini adalah bahwa begitu mereka memasuki sel selama pemuatan, aktivitas esterase seluler memotong bagian ester yang terkandung di dalam pewarna yang menghasilkan perangkap intraseluler dari pewarna. Zat warna yang sensitif terhadap kalsium ini telah digunakan secara luas untuk evaluasi perubahan yang diperantarai reseptor dalam kalsium intraseluler selama beberapa tahun.

Teknik ini melibatkan penggunaan fluorometer standar dan eksperimen dilakukan menggunakan kuvet kuarsa tunggal. Studi dengan banyak sistem reseptor telah menunjukkan bahwa peningkatan kalsium intraseluler yang diperantarai reseptor bersifat sementara dan umumnya berlangsung selama 10 sampai 30 detik sebelum kembali ke tingkat basal. Karena sifat transien ini, pengujian tidak dapat dikonfigurasi ke dalam format pelat mikrotiter. Pembaca pelat fluoresensi standar hanya mampu membaca satu baris pelat pada satu waktu dan sinyal kalsium tidak dapat ditangkap untuk keseluruhan pelat mikrotiter karena respons transien ini. Kemajuan baru baru-baru ini dalam pembaca pelat fluoresensi kini telah membuatnya praktis untuk melakukan uji

kalsium intraseluler dalam format pelat mikrotiter. Kemajuan ini terdiri dari pengembangan pembaca pelat fluoresensi waktu nyata yang juga berisi perangkat penanganan cairan. Dengan pembaca baru ini, pembacaan fluoresensi dimulai sebelum penambahan agonis reseptor. Ini dikombinasikan dengan kemampuan untuk membaca semua sumur sekaligus, telah memungkinkan penangkapan sinyal kalsium sementara yang diprakarsai oleh pengikatan agonis pada reseptor. Langkah-langkah yang terkait dengan uji kalsium intraseluler menggunakan kalsium fluoresen pewarna sensitif dan pembaca pelat waktu nyata ditunjukkan pada Gambar 22.



Gambar 22. Langkah-langkah yang terlibat dalam uji kalsium intraseluler berbasis fluoresensi Uji kalsium intraseluler juga dapat berfungsi sebagai uji untuk mengidentifikasi senyawa yang berinteraksi dengan molekul transduksi sinyal yang terkait dengan peningkatan kalsium intraseluler yang dimediasi reseptor. Target molekul transduksi sinyal ini dapat mencakup Gq, PLC β , reseptor IP3, dan kemungkinan saluran kalsium tipe-L dan saluran CRAC. Karena beberapa target terkait dengan pengujian, ekstrak aktif perlu dievaluasi untuk menentukan tempat kerja di jalur transduksi sinyal yang mengarah pada peningkatan kalsium intraseluler.

4.7 Uji Fungsional *High Throughput* untuk Saluran Ion Ligan-gated

Cara kerja agonis dari sejumlah saluran ion ligan-gated dapat menyebabkan peningkatan kalsium intraseluler. Hal ini dapat terjadi karena baik permeabilitas ion kalsium dari saluran ligand-gated atau depolarisasi membran plasma yang menyebabkan pembukaan saluran kalsium tipe-L. Misalnya, reseptor asam amino merangsang NMDA permeabel terhadap kedua ion Na^+ dan Ca^{2+} dan peningkatan kalsium intraseluler dengan aktivasi NMDA telah didokumentasikan dengan baik (Ascherdkk.,1988). Peningkatan kalsium intraseluler yang menyertai pengikatan NMDA disebabkan oleh masuknya kalsium melalui saluran NMDA serta pembukaan saluran kalsium tipe-L karena depolarisasi membran akibat masuknya ion natrium. Reseptor AMPA dan kainate terkait tidak permeabel terhadap ion kalsium tetapi memungkinkan masuknya ion natrium ke dalam sel yang mengarah ke depolarisasi membran dan pembukaan saluran kalsium tipe-L. Tabel 6 adalah daftar saluran ion ligan-gated untuk peningkatan kalsium intraseluler telah dilaporkan. Uji fungsional *high throughput* untuk reseptor ini dapat dikembangkan menggunakan pewarna sensitif kalsium dan pembaca pelat fluoresensi waktu nyata seperti yang dijelaskan untuk reseptor Gq berpasangan. Banyak aktivitas seluler sel mamalia dikendalikan

oleh protein reseptor tirosin kinase (RPTK). Tirosin kinase ini terlibat dalam regulasi sejumlah program seluler; yang paling menonjol adalah kontrol pertumbuhan dan diferensiasi sel. Karena sifat-sifat ini, tirosin kinase dianggap penting dalam genesis banyak neoplasia. *Receptor Protein Tyrosine Kinase* (RPTK) unik karena tidak hanya memiliki situs pengikatan ligan tetapi juga mengandung aktivitas enzimatis tirosin kinase intrinsik. Contoh RPTK termasuk faktor pertumbuhan epidermal (EGF), faktor pertumbuhan yang diturunkan dari trombosit (PDGF), faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), dan reseptor insulin.\

Tabel 6. Saluran Ion Ligan-gated Mengubah Konsentrasi Kalsium Intraseluler

Reseptor	Reseptor
AMPA	Nicotinic ACh ($\alpha 7$)
Kainate	Purinoreceptor P2X1
NMDA	Purinoreceptor P2X2
Nicotinic ACh (muscle)	Purinoreceptor P2X3
Nicotinic ACh (ganglionic)	Purinoreceptor P2X4
Nicotinic ACh (neuronal CNS)	Purinoreceptor P2Z

4.8 Uji Fungsional Protein Reseptor Tyrosine Kinase

Jalur Transduksi Sinyal Terkait RPTK

RPTK mengaktifkan jalur transduksi sinyal kompleks yang mengatur aktivitas faktor transkripsi inti dan akhirnya mengatur transkripsi gen. Jalur transduksi sinyal yang diaktifkan oleh RPTK umumnya mencakup jalur Ras dan kaskade MAP kinase. Langkah pertama dalam jalur transduksi sinyal setelah pengikatan ligan melibatkan dimerisasi reseptor yang dimediasi ligan. Dimerisasi reseptor kemudian disertai dengan autofosforilasi subunit reseptor intraseluler yang mengarah ke aktivasi domain katalitik tirosin kinase sitoplasma. Langkah selanjutnya adalah interaksi spesifik dari reseptor autofosforilasi dengan molekul transduksi sinyal spesifik.

Interaksi protein-protein antara RPTK autofosforilasi dan molekul transduksi sinyal diatur oleh interaksi yang sangat spesifik dari residu fosfotirosin RPTK dengan domain SH2 (src homology) yang terkandung dalam urutan molekul transduksi sinyal. Domain SH2 terdiri dari sekitar 100 residu asam amino yang mengenali urutan yang sangat terbatas di sekitar residu fosfotirosin pada RPTK. Berdasarkan studi struktural dan biokimia, tampak bahwa 3-5 residu asam amino C-terminal ke fosfotirosin berinteraksi dengan permukaan domain SH2. Domain interaksi protein-protein lain yang ditemukan di beberapa substrat

untuk RPTK, adalah domain SH3. Domain SH3 terdiri dari sekitar 60 asam amino dan mengikat sepuluh situs pengikatan kaya prolin asam amino terkandung dalam protein tertentu.

Beberapa molekul transduksi sinyal yang ditemukan berasosiasi langsung dengan RPTK mamalia yang diaktifkan melalui domain SH2 dan/atau SH3 termasuk PLC γ , PLD, dan PI3-kinase. Beberapa RPTK yang diaktifkan telah diketahui merangsang pergantian PI membran yang menyebabkan peningkatan IP3, DAG, dan kalsium. Efek ini dapat dijelaskan dengan pengamatan bahwa RPTK yang diaktifkan berinteraksi dengan PLC γ melalui interaksi SH2, memfosforilasi dan mengaktifkan PLC γ , yang mengarah pada pergantian PI dan pembentukan IP3, DAG, dan peningkatan kalsium intraseluler. Interaksi lain yang dimediasi SH2 dominan dengan RPTK teraktivasi adalah interaksi dengan PI3-kinase. Bukti terbaru menunjukkan bahwa 85 kDa subunit PI3-kinase dapat terfosforilasi sehingga mengurangi interaksi dengan RPTK dan dapat berfungsi sebagai mekanisme umpan balik negatif untuk aktivasi PI3-kinase.

RPTK juga berasosiasi dengan molekul transduksi sinyal yang tidak memiliki aktivitas enzimatik tetapi bertindak sebagai adaptor. Interaksi protein adaptor ini dengan RPTK juga diatur oleh domain SH2-fosfotirosin dan motif pengenalan SH3. Beberapa contoh protein adaptor mamalia yang terlibat dalam transduksi sinyal RPTK termasuk CRK, NCK, Grb2, dan SHC.

Protein pengikat GTP kecil, Ras, juga memiliki peran penting dalam jalur transduksi sinyal yang diaktifkan oleh RPTK. Ras biasanya berputar antara bentuk terikat PDB tidak aktif dan bentuk terikat GTP aktif. Karena disosiasi PDB dari Ras sangat lambat, Ras cenderung terakumulasi dalam keadaan terikat PDB tidak aktif. Untuk mengaktifkan Ras, protein tambahan, yang disebut faktor pertukaran nukleotida guanin (GNRF), diperlukan untuk memfasilitasi pertukaran PDB untuk GTP. Protein mamalia spesifik, hSos, adalah GNRF yang memiliki peran penting dalam aktivasi Ras. Ras teraktivasi diinaktivasi oleh hidrolisis ikatan GTP menjadi GDP yang biasa disebut sebagai langkah GTPase. Reaksi GTPase dikatalisis oleh protein pengaktif GTPase yang disebut GAP. GAP berinteraksi dengan sejumlah RPTK melalui domain SH2 dan terfosforilasi pada residu tirosin.

Baru-baru ini, telah ditunjukkan bahwa Ras-GTP berinteraksi langsung dengan protein kinase ser/thr, Raf-1. Selain interaksi dengan Raf-1, tampaknya fosforilasi Raf-1 juga diperlukan untuk aktivasi Raf-1 dan hal ini terjadi setelah Raf-1 ditranslokasikan ke membran plasma sebagai akibat dari pengikatan Ras-GTP. Dengan demikian, peran Ras teraktivasi dalam transduksi sinyal RPTK adalah merekrut ser/thr kinase, raf-1, ke membran plasma, di mana sinyal yang dihasilkan tirosin kinase sepenuhnya mengaktifkan membran terikat raf-1. Raf-1 pada gilirannya, mengaktifkan kaskade protein kinase yang sangat dilestarikan sepanjang evolusi. Menurut pengetahuan kami saat

ini, MAP kinase (juga dikenal sebagai MEK), kinase spesifisitas ganda, diaktifkan oleh MAP kinase kinase kinase (juga dikenal sebagai MEKK), Raf-1, atau MOS melalui fosforilasi ser/thr. Aktivasi MEK oleh raf-1 melibatkan fosforilasi dua residu ser yang terpisah empat asam amino di subdomain kinase VIII. MEK kemudian mempromosikan fosforilasi thr dan tyr dari MAP kinase yang mengarah ke aktivasinya. Juga telah disarankan bahwa PKC dapat memfosforilasi dan mengaktifkan Raf-1 dan MEKK. Setelah MAP kinase diaktifkan, ia dapat mentranslokasi ke dalam nukleus, di mana ia dapat memfosforilasi dan mengaktifkan faktor transkripsi seperti Elk-1. Faktor transkripsi lain yang diaktifkan oleh MAP kinase termasuk c-Jun dan c-Fos. Oleh karena itu, MAP kinase berfungsi sebagai relasi antara peristiwa sitoplasma dan inti. Selain faktor transkripsi, satu set substrat untuk MAP kinase adalah protein hulu dari kaskade MAP kinase. Contohnya adalah reseptor NGF, reseptor EGF, PTP2C, Sos, Raf-1, dan MEK. Oleh karena itu, MAP kinase juga dapat berperan dalam mekanisme umpan balik untuk komponen hulu. MAP kinase juga memfosforilasi protein sitoskeletal seperti MAP-1, MAP-2, MAP-4, dan Tau.

4.9 Uji Fungsional *High Throughput* Untuk RPTK

Terdapat beberapa uji berbeda yang dapat berfungsi sebagai uji skrining fungsional untuk RPTK. Ini dapat mencakup pengukuran fosforilasi molekul transduksi sinyal spesifik oleh RPTK seperti dijelaskan di atas, aktivasi Ras, atau MAP kinase, atau aktivasi faktor transkripsi spesifik. Dari pengujian ini, hanya pengujian transkripsi yang dapat menerima skrining hasil tinggi. Pengembangan uji transkripsi akan melibatkan konstruksi plasmid yang mengandung elemen respons faktor transkripsi yang sesuai dan gen reporter seperti luciferase atau β -galactosidase. Sel-sel yang cocok kemudian harus ditransfeksi dengan konstruksi gen ini. Selain uji transkripsi, hanya ada beberapa pilihan lain yang sesuai untuk uji RPTK fungsional *high throughput* dan dirinci di bawah ini.

Uji Kalsium Intraseluler

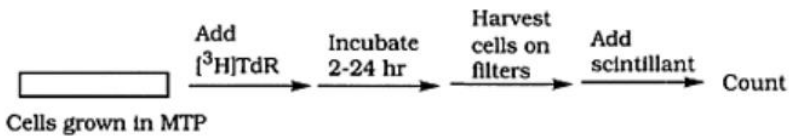
Sebagaimana dinyatakan di atas, beberapa RPTK merangsang PLC γ yang menghasilkan peningkatan IP₃, DAG, dan kalsium intraseluler. Uji kalsium intraseluler *high throughput* yang sama dijelaskan untuk reseptor Gq berpasangan juga dapat diadaptasi sebagai uji fungsional untuk RPTK.

Uji Proliferasi

RPTK mempromosikan proliferasi sejumlah sel manusia tertentu. Oleh karena itu, uji proliferasi sederhana dapat berfungsi sebagai uji reseptor fungsional untuk RPTK. Tugas pertama dalam mengembangkan pengujian semacam itu adalah menemukan sel manusia yang sesuai yang berisi RPTK yang diinginkan. Jika ini dapat dicapai, sejumlah metode berbeda tersedia untuk mengukur proliferasi seluler (sintesis DNA atau aktivitas metabolik) termasuk uji radiometrik di mana penyerapan $[3H]$ timidin diukur, uji kolorimetri menggunakan BrdU, MTT, XTT, atau WST-1, atau uji fluorometrik (Alamar-Blue) mengukur penggabungan purin atau pirimidin bertanda fluoresen. Pengujian ini dapat dikonfigurasi dalam format pelat mikrotiter *high throughput*. Salah satu peringatan potensial menggunakan uji proliferasi seluler untuk skrining ekstrak produk alami adalah bahwa mereka umumnya memerlukan inkubasi yang panjang di mana aktif positif palsu akan dihasilkan karena kemungkinan sitotoksitas ekstrak nonspesifik. Selain itu, menentukan lokus aksi ekstrak aktif dalam pengujian ini dapat menjadi kompleks karena banyaknya molekul transduksi sinyal yang terkait dalam sinyal. Jalur transduksi yang terkait dengan proliferasi yang dimediasi reseptor. Sebagai contoh uji proliferasi, beberapa kit uji proliferasi yang tersedia secara komersial berasal dari Calbiochem yang dirinci di bawah ini.

[³H] Penggabungan Timidin

Sebuah uji proliferasi populer berdasarkan sintesis DNA adalah pengukuran [³H] penggabungan timidin ke dalam DNA. Selama proliferasi sel, DNA harus direplikasi sebelum sel membelah menjadi dua sel anak. Hubungan erat antara sintesis DNA dan penggandaan sel adalah dasar dari [³H] uji proliferasi penggabungan timidin. Kerugian utama menggunakan [³H] uji penggabungan timidin dikaitkan dengan penanganan dan pembuangan limbah radioaktif yang dihasilkan oleh pengujian tersebut. Langkah-langkah yang terkait dengan jenis pengujian ini tercantum pada Gambar 23.



Gambar 23. Langkah-Langkah yang terkait dengan [³H] Proliferasi Penggabungan Timidin

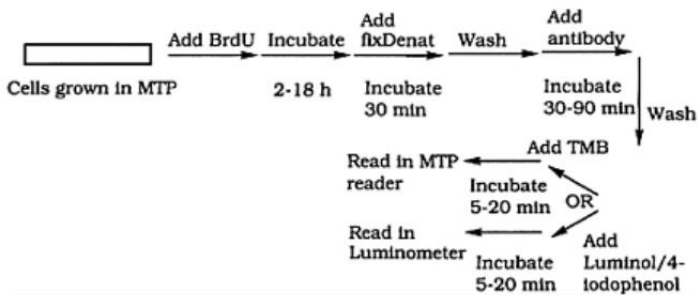
Uji BrdU

Analog timidin, 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), telah digunakan oleh Calbiochem untuk mengembangkan kit uji proliferasi nonradioaktif. Dasar dari pengujian ini adalah bahwa sel-sel yang berproliferasi akan meningkatkan tingkat sintesis DNA dan menggabungkan BrdU ke dalam DNA. Penggabungan BrdU ke dalam DNA diukur menggunakan antibodi monoklonal yang terkonjugasi dengan peroksidase. Baik substrat peroksidase berwarna (TMB) atau substrat *chemiluminescent* (luminol/4-iodophenol) dapat digunakan sebagai substrat untuk peroksidase. Keuntungan dari uji BrdU adalah bahwa pengujian dapat dilakukan dalam satu pelat microtiter dan nonradioaktif. Salah satu kemungkinan kelemahan uji BrdU menggunakan TMB sebagai substrat peroksidase adalah bahwa pengujian mungkin tidak linier pada rentang proliferasi sel yang luas karena penggunaan pembaca pelat. Ini bukan masalah saat menggunakan substrat *chemiluminescent* dan luminometer. Langkah-langkah pengujian yang terkait dengan pengujian ini ditunjukkan pada Gambar 24.

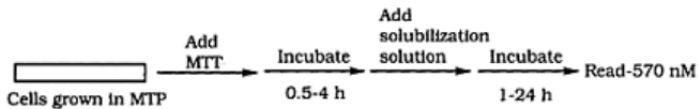
Uji MTT

Calbiochem juga menawarkan kit uji proliferasi MTT yang mengukur aktivitas metabolisme seluler. Dasar dari uji MTT adalah bahwa MTT hanya dibelah untuk membentuk pewarna formazan berwarna oleh sel-sel hidup dengan sistem suksinat-tetrazolium

reduktase yang layak. Setelah pelarutan sel, produk formazan berwarna dapat dengan mudah diukur dengan membaca pelat pada 570 nm pada pembaca pelat. Keuntungan dari uji MTT adalah bahwa pengujian dapat dilakukan dalam satu pelat mikrotiter dan nonradioaktif. Langkah-langkah yang terkait dengan uji MTT ditunjukkan pada Gambar 25.



Gambar 24. Langkah-langkah uji proliferasi BrdU



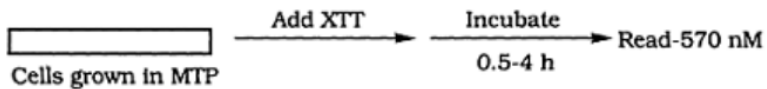
Gambar 25.Langkah-langkah yang terkait dengan uji proliferasi MTT.

Gambar 25. Langkah-langkah uji proliferasi MTT

Uji XTT

Kit uji proliferasi XTT yang ditawarkan oleh Calbiochem mengukur aktivitas metabolisme seluler yang serupa dengan uji MTT. Pengujian ini didasarkan pada pembelahan garam tetrazolium XTT oleh sel-sel hidup dengan adanya reagen kopling elektron. Produk reaksi adalah garam formazan yang dikuantisasi

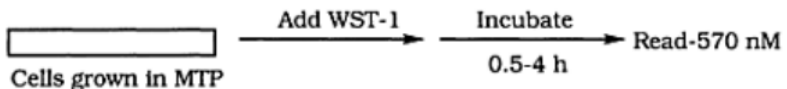
dengan membaca pelat pada 570 nm dalam pembaca pelat. Keuntungan dari uji XTT adalah dapat dilakukan dalam satu pelat, produk reaksi larut, beberapa titik waktu dapat dibuat dalam satu uji, dan merupakan uji nonradioaktif. Langkah-langkah yang terkait dengan pengujian ditunjukkan pada Gambar 26.



Gambar 26. Langkah-langkah uji proliferasi MTT

Pengujian WST-1

Kit uji proliferasi WST-1 yang ditawarkan oleh Calbiochem mirip dengan uji XTT dalam mengukur aktivitas metabolisme seluler dan produk yang dihasilkan adalah garam formazan yang diukur dengan membaca pelat pada 570 nm dengan pembaca pelat. Keuntungan dari uji WST-1 adalah bahwa pengujian dapat dilakukan dalam satu plat, produk reaksi larut, pengukuran berulang dapat dilakukan dalam pengujian, dan nonradioaktif. Langkah-langkah pengujian yang terkait dengan pengujian WST-1 ditunjukkan pada Gambar 27.



Gambar 27. Langkah-langkah Uji Proliferasi WST-1

4.10 Uji Fungsional Reseptor Sitokin

Jalur Transduksi Sinyal Reseptor Sitokin

Studi terbaru menunjukkan bahwa keluarga reseptor sitokin dapat berbagi beberapa fitur dengan keluarga reseptor tirosin kinase termasuk aktivasi tirosin kinase, mitogenesis, aktivasi jalur Ras-MAP kinase, dan aktivasi PI-3-kinase. Pengikatan agonis ke sebagian besar reseptor sitokin juga telah terbukti menghasilkan aktivasi kaskade kinase yang melibatkan Jak kinase yang pada akhirnya menghasilkan fosforilasi dan aktivasi faktor transkripsi seluler spesifik yang disebut protein STAT. Keluarga faktor transkripsi STAT mengatur aktivasi atau inaktivasi gen awal langsung dalam sel responsif sitokin.

Uji Fungsional untuk Reseptor Sitokin

Beberapa uji dapat dipilih sebagai tes fungsional untuk reseptor sitokin. Ini dapat mencakup pengujian untuk aktivasi JAK kinase, PI3-kinase, Ras, atau MAP kinase. Namun, uji khusus ini tidak akan cocok untuk skrining *high throughput* karena akan padat karya. Ada dua jenis uji fungsional *high throughput* yang dapat dibayangkan untuk reseptor sitokin. Uji reseptor sitokin yang paling sederhana akan terdiri dari pengukuran peningkatan sitokin yang diinduksi dalam proliferasi sel yang sesuai yang mengandung reseptor yang diinginkan. Proliferasi seluler dapat dihitung dalam format pelat mikrotiter 96-sumur dengan

metodologi yang sama seperti yang dibahas untuk RPTK. Kalau tidak, uji gen reporter dapat dikembangkan menggunakan elemen respons STAT yang digabungkan dengan gen reporter seperti luciferase atau β -galactosidase. Karena uji proliferasi dan transkripsi melibatkan jalur transduksi sinyal aktivasi yang dimediasi reseptor, lokus aksi ekstrak aktif dapat dikaitkan dengan molekul transduksi sinyal apa pun yang terkait dengan jalur ini. Penting juga untuk menunjukkan bahwa uji proliferasi dan transkripsi umumnya memerlukan inkubasi yang lama (8-24 jam) dimana akan ada potensi tinggi untuk ekstrak aktif positif palsu karena sitotoksitas seluler nonspesifik.

4.11 Uji Fungsional Reseptor Campuran

Teknologi Uji Reseptor Fungsional Melanofor

Sistem uji reseptor fungsional *high throughput* baru menggunakan melanosit kulit katak telah dikembangkan oleh Michael Lerner di Yale yang dapat diterapkan secara luas ke semua reseptor protein G berpasangan dan RPTKs. "*Melanophore Assay Technology*" memanfaatkan respons alami melanosit katak pembawa pigmen yang mengalami perubahan densitas optik cepat yang dimediasi oleh protein G yang digabungkan dan protein reseptor tirosin kinase. Redistribusi pigmen yang dimediasi reseptor ini dapat ditangkap menggunakan pembaca pelat standar. Reseptor mamalia ditransfeksi ke melanosit "hijack" sistem kontrol pigmen alami sel. Ligan yang mengaktifkan reseptor yang ditransfeksi menyebabkan agregasi atau dispersi yang cepat dalam sel tergantung pada sistem transduksi sinyal yang digunakan oleh reseptor. Sistem uji melanofor telah digunakan untuk mengembangkan uji reseptor homogen fungsional untuk lebih dari 37 reseptor manusia yang berbeda (lihat Tabel 7). Tidak diperlukan rekayasa reseptor atau sel dan reseptor transfeksi sementara dan stabil dapat digunakan. Keuntungan dari uji melanofor adalah bahwa hal itu berlaku untuk sejumlah reseptor yang berbeda, pengujian memiliki waktu pembacaan yang cepat (30-60menit), pembacaan langsung dengan sel hidup, pembacaan menggunakan sistem alami dan tidak memerlukan transkripsi

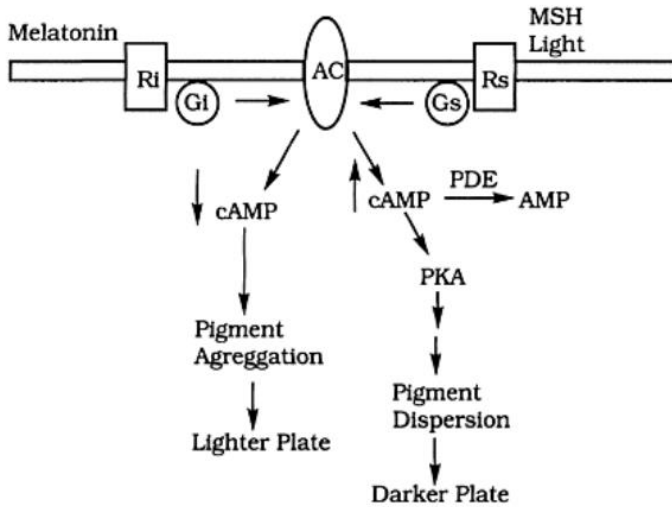
reporter. gen, dan itu adalah uji nonradioaktif. Teknologi pengujian ini dapat dilisensikan untuk digunakan dalam program penemuan obat dari Bunsen Rush, Inc.

Tabel 7. Daftar Penggunaan Reseptor di mana Sistem Melanosom telah Digunakan sebagai Sistem Uji Fungsional

<i>Gs Coupled</i>	<i>Gi Coupled</i>	<i>Gq Coupled</i>	<i>RPTK's</i>
β_2 -Adrenergic	α_2 -Adrenergic	α_1 -Adrenergic	Epidermal Growth
β_1 -Adrenergic	Cannabinoid CB ₁	Angiotensin II	Factor
Dopamine D ₁	Cannabinoid CB ₂	Bradykinin	Platelet-Derived Growth
Dopamine D ₁	Dopamine D ₂	Endothelin ETA	Factor
Prostaglandin EP ₂	Dopamine D ₃	Endothelin ETB	
Prostaglandin I ₂	Dopamine D ₄	Endothelin ETC	
	Muscarinic M ₄	Platelet Activating	
	Neuropeptide Y	Factor	
	δ -opioid	Tachykinin NK ₁	
	κ -opioid	Tachykinin NK ₂	
	μ -opioid	Thrombin	
	MOP2 opioid	Thromboxane	
	Prostaglandin EP ₃		
	Somatostatin SRIF ₁		
	Somatostatin SRIF _{2A}		
	Somatostatin SST ₃		
	Somatostatin SST ₄		
	Somatostatin SST ₅		

Regulasi Reseptor Gs- dan Gi- Berpasangan

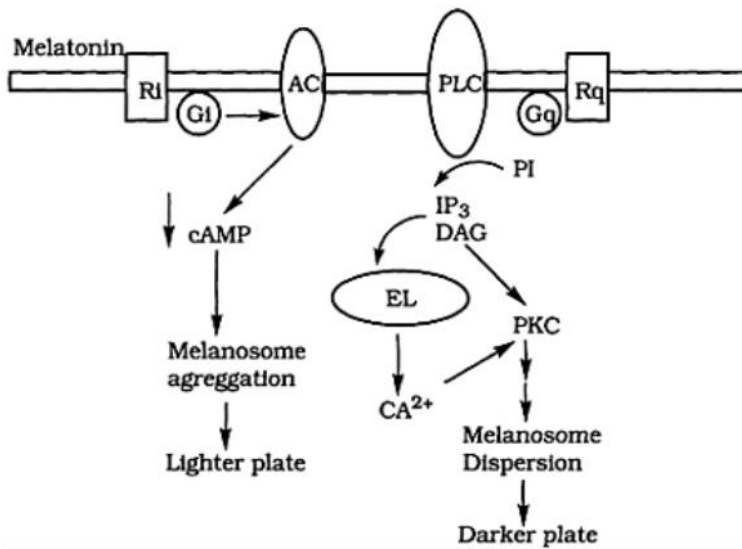
Pendudukan agonis reseptor berpasangan Gs endogen atau diekspresikan dalam melanosit yang diobati dengan melatonin (untuk mempromosikan agregasi melanosom), menyebabkan dispersi pigmen yang cepat. Mekanisme yang tepat dimana aktivasi PKA menyebabkan dispersi melanofor saat ini tidak jelas. Satu langkah penting adalah fosforilasi yang dimediasi PKA dari protein 57-kDa yang terkait dengan organel pigmen. Pendudukan agonis reseptor berpasangan Gi endogen atau yang diekspresikan pada melanosit katak yang diberi perlakuan sebelumnya dengan cahaya atau MSH (untuk merangsang disperse pigmen) akan mendorong agregasi pigmen. Tanggapan ini tampaknya berhubungan dengan pengurangan keadaan terfosforilasi dari protein 57-kDa yang disebutkan di atas yang terkait dengan organel pigmen. Gambar 28 berisi jalur transduksi sinyal yang terkait dengan perubahan yang dimediasi reseptor berpasangan Gs dan Gi dalam dispersi pigmen melanofor.



Gambar 28. Regulasi cAMP terhadap Dispersi Pigmen Melanofor

Reseptor Gq Berpasangan Memediasi Kontrol Dispersi Pigmen Melanosom

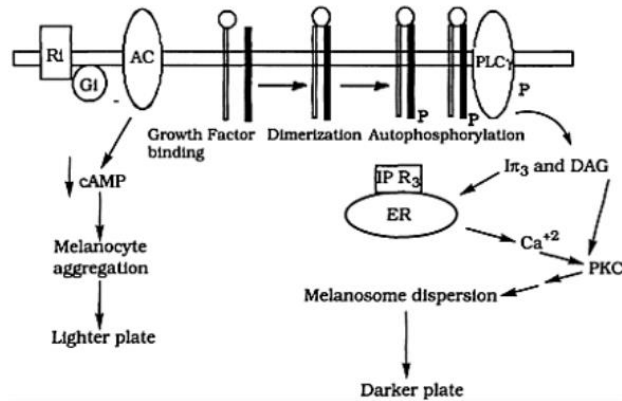
Pendudukan agonis reseptor Gq berpasangan endogen atau diekspresikan dalam melanosit katak menyebabkan dispersi pigmen dalam sel yang diobati melatonin. Respons ini jelas terbukti bergantung pada pembentukan DAG dan aktivasi PKC. Namun, mekanisme bagaimana aktivasi PKC memediasi dispersi pigmen saat ini masih belum jelas. Pergerakan pigmen yang cepat telah terbukti melibatkan fosforilasi protein 53-57 kDa dan redistribusi butiran pigmen dapat dicapai dengan menerapkan inhibitor protein fosfatase, asam okadaat. Gambar 29 menjelaskan langkah-langkah yang terkait dengan stimulasi dispersi melanosom yang dimediasi reseptor Gq berpasangan.



Gambar 29. Dispersi Melansome yang Dimediasi Reseptor Gq Berpasangan

Regulasi RPTK Dispersi Melanosom

Sistem melanofor juga berlaku sebagai uji fungsional untuk RPTK yang mengaktifkan PLC γ dan akhirnya PKC dengan meningkatkan kadar DAG seluler dan kalsium intraseluler. Pengikatan faktor pertumbuhan pada RPTK yang telah ditransfeksi ke melanosit katak yang diberi perlakuan melatonin menyebabkan dispersi pigmen. Dispersi pigmen yang dimediasi RPTK dapat diblokir oleh inhibitor spesifik PKC. Langkah-langkah selanjutnya untuk aktivasi PKC yang mengarah ke dispersi pigmen saat ini tidak diketahui. Gambar 30 menjelaskan langkah-langkah yang terkait dengan perubahan yang dimediasi RPTK dalam distribusi melanosit.



Gambar 30. Dispersi melanosom yang dimediasi RPTK

Seleksi Reseptor dan Amplifikasi Teknologi Pengujian Reseptor Fungsional

Seleksi reseptor dan teknologi amplifikasi (RSAT), yang telah dikembangkan oleh Mark Brann di *University of Vermont*, dapat digunakan untuk mengembangkan uji fungsional reseptor homogen untuk berbagai macam reseptor mamalia termasuk reseptor G-protein berpasangan, RPTK, dan reseptor sitokin. Sebuah perusahaan baru, bernama *Receptor Technologies Inc.*, telah dibentuk untuk mengkomersialkan teknologi ini. Teknologi RSAT didasarkan pada pengamatan eksperimental bahwa reseptor mamalia tertentu mampu berperilaku sebagai onkogen yang bergantung pada ligan. Dalam mengembangkan uji fungsional reseptor, sel mamalia seperti sel NIH 3T3 transien dikotransfeksi dengan reseptor cDNA yang diinginkan dan gen β -galaktosidase menggunakan metode pengendapan kalsium fosfat. Agonis yang mengikat diekspresikan reseptor mempromosikan keuntungan pertumbuhan selektif yang diukur dengan peningkatan aktivitas β -galaktosidase. Sel-sel yang tidak ditransfeksi dihambat kontakannya tanpa adanya agonis.

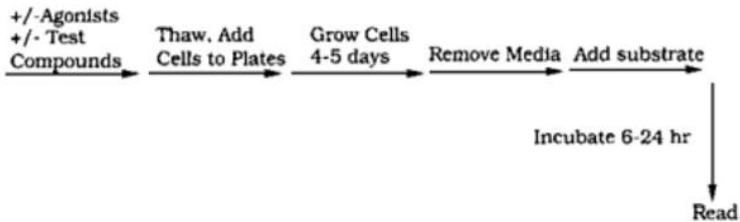
Sistem uji RSAT berlaku untuk berbagai reseptor yang memanfaatkan keragaman mekanisme transduksi sinyal termasuk reseptor G-protein berpasangan, reseptor tirosin kinase, reseptor sitokin terkait JAK/STAT, dan onkogen transformasi (Tabel 7). Keuntungan utama dari teknologi ini meliputi: ini adalah uji fungsional *high throughput* yang dapat diotomatisasi, sejumlah

besar sel dapat ditransfeksi dan kemudian dibekukan dan disimpan saat dibutuhkan, dan beberapa reseptor dapat ditransfeksi ke dalam sel untuk membuat screen agonis untuk beberapa reseptor pada satu waktu. Satu kekhawatiran potensial dengan uji RSAT adalah bahwa inkubasi berlangsung selama periode 4-5 hari. Potensi sitotoksitas ekstrak produk alami dalam pengujian selama masa inkubasi yang diperpanjang ini bisa sangat besar.

Teknologi reseptor sekarang menjual beberapa kit RSAT untuk reseptor manusia yang berbeda yang dapat digunakan untuk skrining ekstrak produk alami. Kit uji tersedia untuk sebagian besar reseptor yang tercantum dalam Tabel 8. Langkah-langkah pengujian yang terlibat dalam pengujian RSAT diberikan pada Gambar31.

Tabel 8. Aplikasi Sistem Pengujian RS AT

Gs Coupled	Gs Coupled	Gq Coupled	RPTC's	JAK/STAT
Dopamine D ₃	α_{2A} -Adrenergic	α_{1A} -Adrenergic	Trk A,B,C	GM-CSF
	α_{2B} -Adrenergic	α_{1B} -Adrenergic	PDFG	
	α_{2C} -Adrenergic	α_{1C} -Adrenergic		
	Dopamine D ₂	Angiotensin AT1		
	Dopamine D ₂	Bombesin BB1		
	Muscarinic M ₂	Bombesin BB2		
	Muscarinic M ₄	Histamine H1		
	μ -Opioid	Interleukin-8A		
	κ -Opioid	Endothelin ETA		
	Prostanoid Ep ₃	Endothelin ETB		
	Serotonin 5HT _{1A}	Muscarinic M ₁		
	Serotonin 5HT _{1D}	Muscarinic M ₃		
		Neurokinin NK1		
		Neurokinin NK2		
		Neurokinin NK3		
		Prostanoid EP ₁		
		Prostanoid FP		
		Prostanoid TP		
		Serotonin 5HT _{2A}		
		Vasopressin V _{1A}		
		Vasopressin V _{1B}		



Gambar 31. Langkah-langkah yang terkait dengan uji RSAT.

BAB V. UJI PENGIKAT RADIOLIGAND



Reseptor manusia telah terbukti berkaitan dengan banyak penyakit dan gangguan manusia. Dengan demikian, reseptor ini telah menjadi target molekuler untuk penemuan obat. Ada beberapa superfamili berbeda yang terkait secara struktural dari reseptor manusia termasuk reseptor protein-G berpasangan, reseptor sitokin, protein reseptor tirosin kinase, saluran ion ligan-gated, dan reseptor steroid dan anggota dari semua superfamili ini telah ditargetkan dalam program penemuan obat. Skrining untuk agonis dan/atau antagonis berbagai reseptor secara tradisional telah dilakukan dengan menggunakan uji pengikatan radioligand. Pengujian ini relatif sederhana untuk dilakukan dan didasarkan pada prinsip-prinsip pengujian pengikatan kompetitif dimana ligan berlabel radio bersaing dengan ligan tidak berlabel untuk mengikat reseptor dalam sel atau pada membran permukaan sel. Dengan demikian, senyawa atau ekstrak produk alam dievaluasi kemampuannya untuk bersaing dengan ligan yang diketahui dan kompetisi ini diukur dengan penurunan ikatan ligan yang diketahui berlabel. Fokus dari bagian ini adalah untuk menggambarkan aspek penting dari pengembangan dan validasi uji pengikatan radioligand reseptor yang digunakan untuk skrining produk reaksi kimia kombinatorial dan ekstrak produk alami. senyawa atau ekstrak produk alam dievaluasi kemampuannya untuk bersaing dengan ligan yang diketahui dan kompetisi ini diukur dengan penurunan ikatan ligan yang diketahui berlabel.

5.1 Pertimbangan Penting untuk Mengembangkan Uji Pengikatan Radioligand

Ada parameter uji tertentu yang perlu dievaluasi secara hati-hati untuk pengembangan uji pengikatan radioligand untuk skrining ekstrak produk alami. Parameter ini tercantum dalam Tabel 9.

Tabel 9. Uji Parameter Spesifik yang Perlu Dipertimbangkan untuk Pengembangan

- Sumber reseptor dan konsentrasi pengujian
- Pemilihan radioligand dan konsentrasi pengujian
- Pemilihan kondisi inkubasi pengujian
- Pemilihan buffer pengujian
- Pemilihan volume pengujian
- Pemilihan metodologi untuk pemisahan radioligan bebas dan terikat

5.2 Sumber Reseptor dan Konsentrasi Pengujian

Garis Sel Manusia Nonrekombinan

Garis sel manusia non-rekombinan yang stabil sering dapat digunakan sebagai sumber reseptor untuk mengembangkan uji skrining. Keuntungan menggunakan sumber ini meliputi: sel mengandung reseptor yang tidak terganggu, biasanya terdapat modifikasi pasca-translasi reseptor normal, dan sistem transduksi sinyal yang diaktifkan secara fisiologis hadir untuk pengembangan uji fungsional reseptor. Kemungkinan kekurangan mungkin termasuk: adanya subtipe reseptor yang tidak diinginkan, desensitisasi dan internalisasi reseptor yang dimediasi agonis, dan reseptor dapat diubah secara struktural dalam sel yang diubah.

Sediaan Membran dari Sel dan Jaringan Nonrekombinan

Membran plasma mentah yang dibuat dari sel manusia dan mengekspresikan reseptor yang diminati banyak digunakan untuk uji pengikatan radioligand. Keuntungan menggunakan preparat membrane meliputi: desensitisasi dan internalisasi yang dimediasi agonis tidak terjadi, preparat besar dapat dibuat dengan mudah dan dibekukan sampai dibutuhkan, terdapat modifikasi reseptor pascatranslasi normal, dan nukleotida guanin dapat dicuci untuk meningkatkan ikatan agonis afinitas tinggi ke reseptor protein-G berpasangan. Kemungkinan kerugian meliputi: subtipe reseptor

yang tidak diinginkan mungkin ada dan molekul transduksi sinyal terkait reseptor mungkin tidak ada untuk mengembangkan uji fungsional.

Reseptor Rekombinan yang Mengandung Sel atau Membran

Keuntungan utama menggunakan sel atau membran rekombinan dari sel rekombinan sebagai sumber reseptor untuk uji pengikatan radioligand adalah bahwa mereka dapat menyediakan populasi reseptor manusia yang murah, konsisten, dan murni untuk skrining sejumlah besar senyawa atau ekstrak. Kepadatan reseptor yang diekspresikan dalam sel seringkali dapat ditingkatkan melebihi tingkat fisiologis yang memungkinkan peningkatan rasio sinyal kebisingan dan penggunaan jumlah membran yang lebih rendah. Sejumlah besar sel rekombinan dapat ditingkatkan menggunakan labu pemintal atau bioreaktor, membran dapat disiapkan, dan disimpan sampai diperlukan untuk pengujian. Kemungkinan kerugian menggunakan sel rekombinan atau membran sel rekombinan meliputi: kloning dan mengekspresikan reseptor yang diinginkan bisa jadi sulit dan memakan waktu, Beberapa sistem ekspresi yang berbeda dapat digunakan untuk reseptor manusia rekombinan termasuk beberapa jenis sel mamalia, sel serangga, ragi atau bakteri. Pertimbangan penting untuk memilih sistem ekspresi reseptor akan mencakup apakah reseptor endogen hadir, apakah modifikasi reseptor pasca-

translasi yang sesuai akan terjadi, apakah molekul transduksi sinyal yang sesuai hadir untuk mengembangkan uji reseptor fungsional, dan sistem ekspresi mana yang akan memberikan jumlah terbesar dari ekspresi reseptor. reseptor dengan biaya terendah.

Pemilihan Radioligand dan Konsentrasi Pengujian

Untuk setiap reseptor tertentu, seringkali ada beberapa radioligand berbeda yang tersedia secara komersial untuk digunakan dalam mengembangkan uji pengikatan radioligand. Ada beberapa pertimbangan penting yang harus dibuat ketika memilih radioligand yang sesuai dan pertimbangan ini tercantum dalam Tabel 10.

Tabel 10. Pertimbangan Memilih Radioligan

- Afinitas reseptor
- Aktivitas spesifik
- Ikatan nonspesifik
- Selektivitas reseptor
- Agonis atau antagonis
- Jenis radioisotop

Radioligan yang dipilih harus memiliki afinitas tinggi untuk reseptor sehingga pengujian lebih sensitif, konsentrasi radioligan yang rendah dapat digunakan untuk meminimalkan

biaya pengujian, dan tingkat pengikatan nonspesifik dapat diminimalkan. Demikian pula, radioligand yang dipilih harus memiliki aktivitas spesifik yang tinggi untuk alasan yang sama. Ligan aktivitas spesifik yang tinggi juga penting ketika preparasi membran yang digunakan mengandung reseptor dengan kepadatan rendah. Radioligand juga harus memiliki ikatan nonspesifik yang rendah yang memungkinkan maksimalisasi rasio sinyal kebisingan. Radioligan yang dipilih juga harus selektif untuk sub tipe reseptor yang diinginkan, terutama jika sub tipe reseptor terkait ada dalam preparasi reseptor yang digunakan.

Untuk banyak reseptor, baik agonis dan antagonis radioaktif mungkin tersedia secara komersial untuk digunakan dalam uji pengikatan dan dalam beberapa kasus, antagonis lebih disukai daripada agonis. Misalnya, antagonis umumnya lebih disukai untuk mengembangkan uji pengikatan untuk reseptor protein-G berpasangan. Alasan untuk preferensi ini adalah karena pengaruh selektif nukleotida guanin endogen pada pengikatan agonis. Hanya pengikatan agonis keseimbangan afinitas rendah yang dapat dideteksi di seluruh sel karena adanya nukleotida guanin endogen yang mendorong konversi tempat pengikatan agonis afinitas tinggi ke afinitas rendah. Sebaliknya, pengikatan antagonis tidak dipengaruhi oleh nukleotida guanin dan pengikatan afinitas tinggi terdeteksi. Oleh karena itu, antagonis diperlukan untuk pelabelan studi pengikatan menggunakan sel utuh. Demikian pula, pengikatan agonis ke membran yang

mengandung tingkat signifikan nukleotida guanin endogen juga akan berkurang menjadi afinitas rendah. Karena potensi kontaminasi membrane ini, selama preparasi antagonis umumnya lebih disukai untuk studi pengikatan radioligand ke reseptor protein-G berpasangan.

Radioligan antagonis juga lebih disukai untuk uji pengikatan reseptor sitokin karena agonis mempromosikan internalisasi reseptor yang cepat. Namun, tidak ada antagonis reseptor sitokin yang tersedia untuk aplikasi ini. Antagonis radioligan juga lebih disukai untuk uji pengikatan reseptor saluran ion gerbang ligan karena agonis dapat meningkatkan desensitisasi reseptor yang cepat. Pertimbangan terakhir dalam memilih radioligand yang sesuai adalah pemilihan radioisotop. Ligan *tritiated* atau *radioiodinated* paling sering digunakan dalam uji skrining. Penting untuk dicatat bahwa ligan radioiodinasi memiliki waktu paruh yang relatif pendek dan peluruhan radioaktif harus diperhitungkan selama penggunaan radioligan. Peluruhan yang signifikan sering dimanifestasikan dalam uji pengikatan dengan peningkatan pengikatan nonspesifik. Tabel 11 mencantumkan beberapa karakteristik penting dari radioisotop yang umum digunakan.

Tabel 10. Karakteristik Radioisotop yang Digunakan untuk Studi Ikatan Radioligand

Isotope Spesifik (Ci/mmol)	Radioaktivitas	Half-life (tahun)	Pertimbangan Lain
[³ H]	40	12.3 tahun	Bioaktivitas ligan biasanya tidak berubah dengan tritiasi. Stabil untuk waktu yang lama
[¹²⁵ I]	2125	60.2 hari	Mebutuhkan tirosin atau sistem siklik tak jenuh, terutama digunakan ketika kepadatan reseptor rendah. Tidak diperlukan cairan sintilasi. Umumnya hanya stabil selama sebulan. Aktivitas biologis dapat diubah dengan iodinasi
[³² P]	9760	14.3 hari	Waktu paruh yang pendek adalah masalah

Isotope Spesifik (Ci/mmol)	Radioaktivitas	Half-life (tahun)	Pertimbangan Lain
			teknis
[14 _c]	0.06	5730 tahun	Aktivitas spesifik terlalu rendah

Konsentrasi uji akhir radioligan yang digunakan dalam pengujian juga merupakan variabel penting dalam mengembangkan uji pengikatan radioligan. Biasanya, konsentrasi radioligand Kd (1/2 dari konsentrasi jenuh) digunakan. Ada kemungkinan bahwa konsentrasi yang lebih rendah dapat ditambahkan jika radioligan aktivitas spesifik tinggi tersedia atau jika kepadatan reseptor tinggi hadir dalam persiapan reseptor. Meminimalkan konsentrasi radioligand akan mengurangi biaya pengujian, meminimalkan pengikatan nonspesifik, dan mengurangi jumlah limbah radioaktif.

Pemilihan Kondisi Pengujian Inkubasi

Untuk percobaan kejenuhan radioligan dan kompetisi, salah satu model teoritis yang digunakan adalah kesetimbangan. Dengan demikian, waktu inkubasi harus cukup untuk memastikan bahwa kesetimbangan atau pengikatan radioligand keadaan tunak

tercapai selama inkubasi uji. Periode waktu yang diperlukan untuk mencapai kesetimbangan tergantung pada afinitas dan konsentrasi radioligan dan suhu inkubasi pengujian. Untuk sebagian besar radioligan dengan K_d nilai dalam kisaran nanomolar rendah, keseimbangan biasanya dicapai dalam 20-60 menit pada suhu ruang dengan adanya konsentrasi radioligan K_d . Sebagian besar uji pengikatan reseptor dapat dengan mudah dilakukan pada suhu ruang. Namun, ada pengecualian. Misalnya, uji pengikatan sitokin umumnya dilakukan pada 0–4°C untuk mengurangi internalisasi reseptor yang diperantarai agonis cepat yang terjadi pada suhu yang lebih tinggi. Selain itu, uji pengikatan menggunakan radioligan peptida biasanya dilakukan pada suhu ruang atau lebih rendah untuk meminimalkan potensi proteolisis yang dapat terjadi pada suhu fisiologis. Pencantuman protease inhibitor umumnya dianjurkan saat menggunakan radioligan peptida.

Pemilihan Buffer Pengujian

Secara umum, uji pengikatan radioligand dilakukan pada pH fisiologis. Ada beberapa buffer yang tersedia secara komersial yang memiliki kapasitas buffer yang baik pada pH fisiologis. Buffer yang berbeda harus dievaluasi untuk menentukan mana yang memberikan rasio optimal dari pengikatan spesifik ke nonspesifik.

Pemilihan Volume Pengujian

Total volume uji untuk uji pengikatan radioligand harus diminimalkan untuk menghemat reagen yang mahal. Volume pengujian berkisar antara 50 hingga 200 L, biasanya digunakan dan volume umumnya dibatasi oleh ketepatan perangkat penanganan cairan yang digunakan. Dalam beberapa kasus di mana kepadatan reseptor rendah, volume uji yang lebih besar hingga 500-1000 L mungkin diperlukan. Teknologi baru sekarang sedang dikembangkan untuk memungkinkan pengeluaran reagen dalam jumlah nanoliter dan kemungkinan teknologi ini akan diterapkan untuk mengurangi volume uji pengikatan radioligand.

Pemilihan Metodologi Pemisahan Bebas dan Terikat Radioligan

Setelah inkubasi, radioligan bebas dan terikat perlu diselesaikan sehingga hanya ligan terikat yang diukur. Ada tiga metode utama yang digunakan, dialisis ekuilibrium, sentrifugasi, dan filtrasi vakum melalui filter serat kaca. Untuk skrining volume tinggi, filtrasi vakum adalah satu-satunya metode pilihan untuk menyelesaikan radioligand bebas dan terikat. Prinsip di balik filtrasi adalah bahwa filter akan mempertahankan radioligand yang terikat pada fragmen membran atau sel sementara radioligand yang tidak terikat melewati filter. Radioligan sisa yang ditahan oleh filter dihilangkan dengan pencucian filter berikutnya dengan buffer es dingin. Salah satu persyaratan untuk prosedur

pencucian ini adalah disosiasi radioligand harus minimal selama langkah pencucian. Karena itu, hanya radioligan dengan afinitas tinggi dan laju disosiasi lambat yang dapat digunakan dalam uji filtrasi. Radioligan dengan afinitas kurang dari 100 nM umumnya tidak dapat dikenai uji filtrasi karena disosiasi akan terjadi dalam sepersekian detik (Yammamuradkk1985). Bahkan setelah pencucian, sejumlah besar radioligand bebas masih dapat dipertahankan pada filter yang menghasilkan peningkatan tingkat pengikatan nonspesifik. Sebagian besar filter serat kaca tersedia dengan ukuran pori yang berbeda dan disarankan untuk menguji beberapa ukuran untuk menentukan mana yang memberikan ikatan filter nonspesifik terendah. Dalam kasus tertentu, pengikatan non-spesifik juga dapat dikurangi dengan perlakuan kimia terhadap filter. Misalnya, filter retensi positif radioligan yang dibebankan ke filter serat kaca dapat dikurangi dengan melapisi filter dengan polietilenimin.

Langkah-Langkah dalam Mengembangkan dan Memvalidasi Uji Ikatan Radioligand

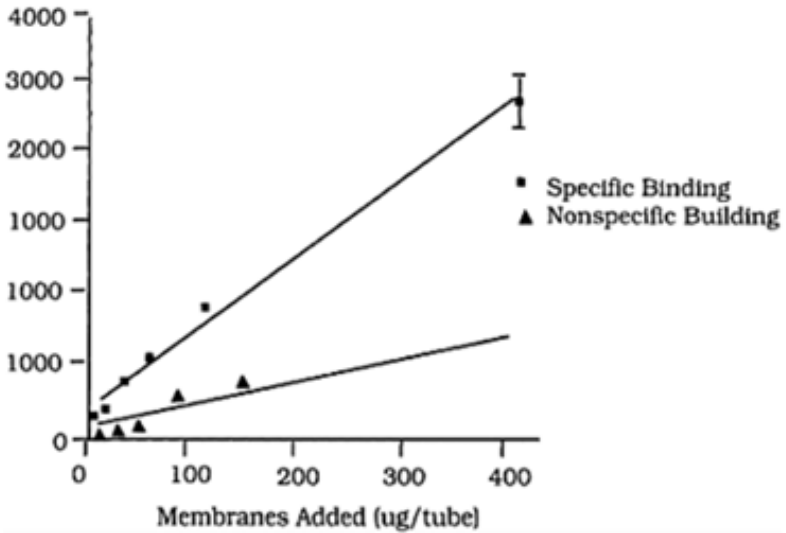
Bagian berikut menjelaskan pengembangan dan validasi uji pengikatan radioligand membrane untuk reseptor interleukin-8. Ini akan menjadi contoh untuk mengilustrasikan banyak poin mengenai pengembangan uji pengikatan radioligand yang dibuat di bagian sebelumnya. Interleukin-8 (IL-8) adalah kemokin pro-inflamasi penting yang mengikat neutrophil manusia dan mendorong kemotaksis dan degranulasi neutrofil. Reseptor IL-8 telah dikarakterisasi secara farmakologis dan dikloning dan diurutkan. Reseptor IL-8 adalah anggota dari keluarga reseptor berpasangan protein-G yang berpasangan secara khusus dengan protein-G dan merangsang fosfolipase β (PLC β) yang mengarah pada peningkatan hidrolisis fosfatidilinositol membran dan peningkatan konsentrasi intraseluler inositol-1,4,5-trifosfat (AKU P3), diasilgliserol (DAG), dan kalsium intraseluler. Beberapa perusahaan farmasi telah mengembangkan uji pengikatan radioligand IL-8 untuk skrining antagonis reseptor spesifik yang mungkin berguna secara terapeutik sebagai agen anti-inflamasi.

5.3 Evaluasi Linearitas Membran Sel

Langkah pertama dalam mengembangkan uji pengikatan radioligand adalah menentukan konsentrasi reseptor yang optimal untuk dimasukkan dalam pengujian. Hal ini dicapai dengan mengukur pengikatan total, spesifik, dan nonspesifik sebagai fungsi penambahan jumlah sel atau membran yang meningkat. Pengikatan nonspesifik ditentukan dengan mengukur pengikatan radioligan dengan adanya konsentrasi ligan yang tidak berlabel (100-1000 kali lipat lebih tinggi dari nilai radioligand K_d). Pengikatan spesifik dihitung dengan mengurangi ikatan nonspesifik dari ikatan total. Konsentrasi radioligan yang optimal adalah konsentrasi di mana total pengikatan adalah sinyal yang relatif tinggi (ribuan cpm) dan tingkat pengikatan nonspesifik diminimalkan. Pengikatan nonspesifik dapat terjadi pada filter serta komponen membran atau sel. Setelah situs pengikatan filter jenuh, pengikatan nonspesifik umumnya akan meningkat secara linier dengan meningkatnya konsentrasi sel atau membran. Secara optimal, pengikatan nonspesifik harus berkisar antara 0-20% untuk sebagian besar radioligan. Jika pengikatan nonspesifik ke filter tinggi, perawatan filter yang dirancang untuk mengurangi ini harus dievaluasi. Neutrofil manusia dipilih sebagai sumber reseptor IL-8 manusia untuk mengembangkan uji pengikatan radioligand IL-8. Keputusan dibuat untuk menggunakan membran kasar sebagai sumber reseptor daripada neutrofil utuh sehingga

sediaan membran skala besar dapat dibuat dan disimpan sampai diperlukan untuk skrining. Neutrofil diisolasi dari darah manusia menggunakan *Ficoll Paque* dan sel-sel diganggu menggunakan bom kavitasi nitrogen cair dengan adanya campuran protease inhibitor.

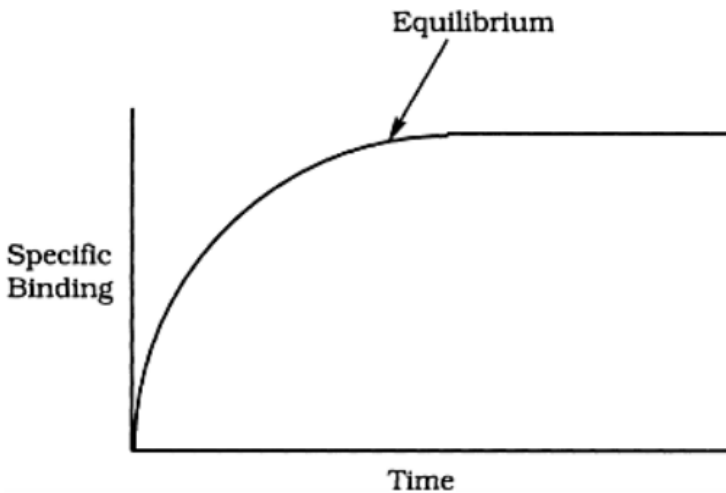
Membran plasma neutrofil kasar diisolasi dengan sentrifugasi pada 40.000 X g. [125I] IL-8 digunakan sebagai radioligand dan tidak ada alternatif lain yang tersedia secara komersial. Sebuah konsentrasi 250 nM IL-8 dipilih untuk menentukan pengikatan nonspesifik. Pemisahan terikat dan bebas [125I] IL-8 dicapai dengan skrining vakum melalui filter serat kaca Whatman GF/B yang diolah PEI. Hasil percobaan linearitas membran di mana pengikatan spesifik dan nonspesifik dari 1 nM [125I] IL-8 diukur dengan adanya antara 6 dan 400 g protein / tabung ditunjukkan pada Gambar32. Rasio pengikatan spesifik terhadap pengikatan nonspesifik adalah 9:1 pada konsentrasi membran tertinggi yang diuji. Untuk menghemat membran, konsentrasi 30 g/tabung dipilih untuk pengujian selanjutnya. Pengikatan nonspesifik pada konsentrasi ini umumnya 20% dari total pengikatan yang memberikan uji rasio sinyal kebisingan sekitar 5:1. Mayoritas pengikatan nonspesifik ditentukan untuk filter GF/B dan agak dikurangi dengan pengobatan PEI (data tidak ditampilkan).



Gambar 32. *[¹²⁵I] IL-8 mengikat (1nM) untuk meningkatkan konsentrasi membran neutrofil manusia. Inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang sesuai dengan kondisi inkubasi yang dilaporkan untuk [¹²⁵I] IL-8 mengikat seluruh neutrofil.*

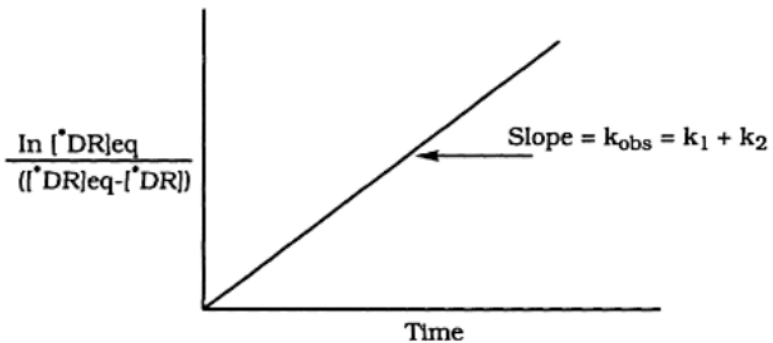
5.4 Waktu Asosiasi dan Disosiasi

Alasan utama untuk melakukan percobaan kursus waktu asosiasi adalah untuk menentukan kapan pengikatan radioligand kesetimbangan tercapai sehingga interval inkubasi dapat dipilih untuk pengujian. Eksperimen kursus waktu asosiasi hanya dilakukan dengan mengukur pengikatan spesifik dari konsentrasi radioligand yang tetap sebagai fungsi dari waktu inkubasi. Gambar 33 menunjukkan plot representatif dari data kursus waktu asosiasi yang tidak diubah untuk menggambarkan waktu ketika keseimbangan tercapai.



Gambar 33. Data Kursus Waktu Asosiasi Radioligand Representatif

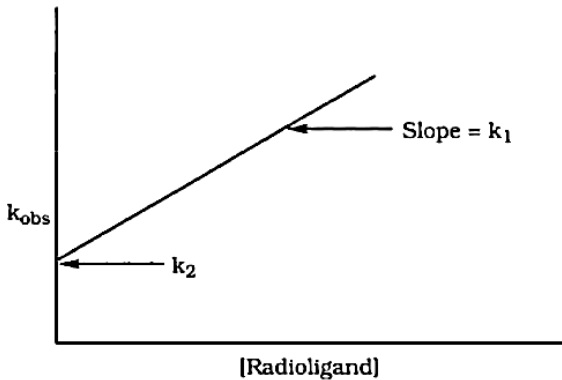
Waktu asosiasi untuk reaksi biomolekuler sederhana harus terdiri dari komponen eksponensial tunggal. Equilibrium dalam perjalanan waktu menunjukkan kapan pengikatan keseimbangan tercapai. Pada titik ini, laju asosiasi dan disosiasi radioligan adalah sama. Data pengikatan kursus waktu asosiasi di atas dapat diubah secara grafis sehingga konstanta laju yang diamati (k_{obs}) dapat ditentukan. Gambar 34 menunjukkan contoh seperti itu transformasi data pengikatan kursus waktu asosiasi dimana $\ln \frac{[DR]_{eq}}{([DR]_{eq} - [DR])}$ diplot pada sumbu y dan waktu diplot pada sumbu x. k_1' adalah orde pertama semu



Gambar 34. Data Transformasi pengikatan kursus waktu asosiasi

Konstanta laju asosiasi dan k_2 sesuai dengan konstanta disosiasi. Penyimpangan dari plot transformasi data linier umumnya menunjukkan bahwa pengikatan bukanlah reaksi biomolekuler yang sederhana dan dapat menunjukkan bahwa kooperatifitas atau beberapa populasi situs pengikatan terjadi. Data juga dapat diplot ulang untuk menentukan konstanta laju asosiasi k_1 dari k_{obs} jika beberapa kursus waktu asosiasi

dilakukan pada konsentrasi radioligand yang bervariasi. Itu figur perwakilan (Gambar 35) yang ditunjukkan di bawah ini mewakili bagaimana k_1 dapat ditentukan secara grafis.

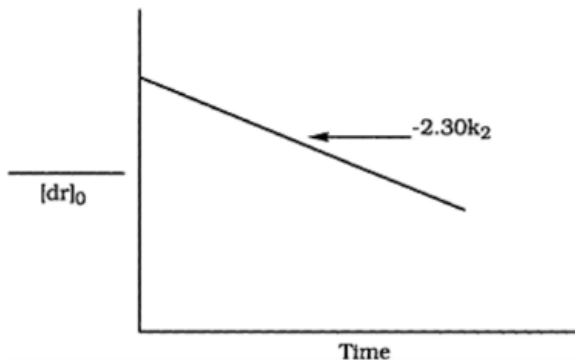


Gambar 35. Data Replot pengikatan kursus waktu asosiasi yang diubah

Evaluasi kursus waktu disosiasi juga penting untuk dilakukan sehingga dapat ditentukan apakah kompleks ligan-reseptor cukup stabil selama prosedur filtrasi. Eksperimen waktu disosiasi dilakukan dengan menginkubasi sel atau membran dan radioligan selama periode yang cukup untuk mencapai keseimbangan, penambahan 100-1000 kali lipat berlebih pada ligan tidak berlabel untuk memulai disosiasi, diikuti dengan pengukuran pengikatan sebagai fungsi waktu. Disosiasi juga dapat dimulai secara eksperimental dengan pengenceran tak terbatas dari campuran inkubasi. Banyak peneliti menyarankan melakukan

kursus waktu disosiasi menggunakan kedua metode untuk memulai disosiasi. Gambar 36 menunjukkan kurva perjalanan waktu disosiasi representatif untuk spesies bimolekuler orde pertama.

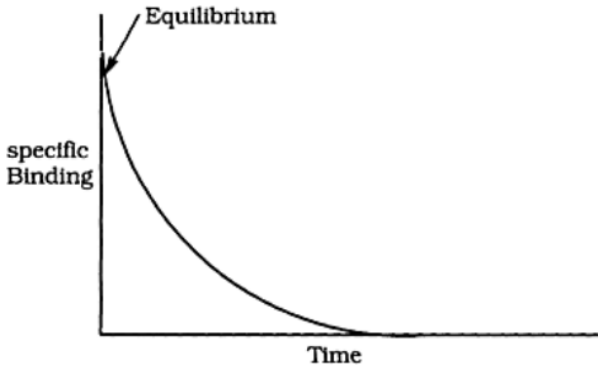
Radioligan yang memiliki waktu setengah disosiasi 10 detik atau kurang, pemisahan ligan bebas dan terikat dengan filtrasi mungkin tidak tepat karena ketidakstabilan kompleks liganreseptor selama langkah pencucian.



Gambar 36. Data Transformasi pengikatan kursus waktu disosiasi

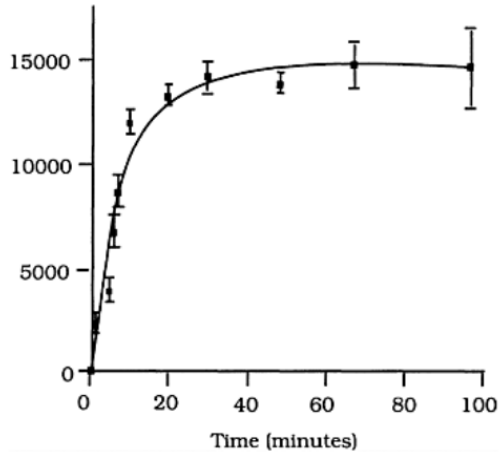
Mirip dengan contoh umum di atas, kinetika asosiasi spesifik [¹²⁵I] Pengikatan IL-8 pada membran neutrofil manusia selanjutnya dievaluasi untuk menentukan kapan keseimbangan tercapai dan pada akhirnya berapa lama inkubasi harus dilakukan untuk pengujian (Gambar 37). Fungsi asosiasi monoeksponensial menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier yang disebut Prism. Perkiraan untuk paruh waktu

asosiasi 5 menit ditentukan menunjukkan kinetika asosiasi yang relatif cepat.



Gambar 37 Data pengikatan kursus waktu disosiasi representatif

Transformasi data kursus waktu disosiasi untuk reaksi orde pertama dengan memplot. Catatan $10 \log \frac{[DR]}{[DR]_{HAI}}$ vs waktu akan menghasilkan plot linier dengan kemiringan sama dengan $2,303 k_2$. Penyimpangan dari linearitas dapat menunjukkan kooperatif positif atau keberadaan beberapa populasi reseptor. Representasi dari transformasi ini ditunjukkan pada Gambar 38.

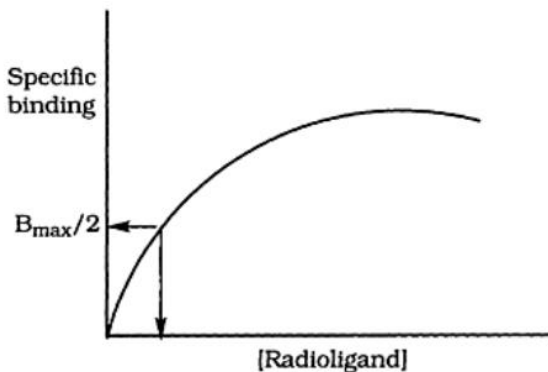


Gambar 38: *Kursus waktu asosiasi untuk [¹²⁵I] IL-8 mengikat neutrofil manusia membran. Konsentrasi 1 nM [¹²⁵I] IL-8 dan 30 ug/tabung membran neutrofil digunakan dalam percobaan ini. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang untuk periode waktu yang ditunjukkan. Titik data mewakili mean+/-SEM dari penentuan rangkap tiga pada setiap titik waktu.*

Eksperimen kursus waktu disosiasi juga dilakukan dan data disosiasi ditemukan paling sesuai dengan fungsi peluruhan monoeksponensial menggunakan program komputer Prism (data tidak ditampilkan). Perkiraan waktu paruh untuk disosiasi 40 menit diperoleh yang menunjukkan bahwa disosiasi radioligan yang dapat diabaikan akan terjadi selama pengenceran dengan buffer es dingin dan filter pencuci untuk menghilangkan ikatan yang tidak terikat. ¹²⁵I]IL-8 dari filter.

5.5 Evaluasi Isoterm Saturasi

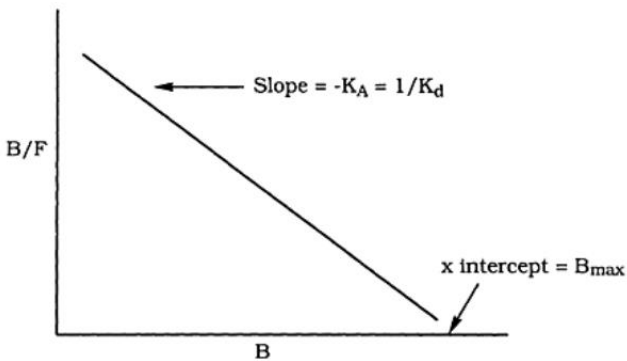
Kriteria penting untuk uji pengikatan radioligand yang valid adalah bahwa pengikatan harus dapat dijenuhkan karena kepadatan reseptor yang terbatas diprediksi ada. Eksperimen saturasi dilakukan dengan mengukur ikatan total, spesifik, dan nonspesifik sebagai fungsi dari peningkatan konsentrasi radioligan. Biasanya, konsentrasi radioligand yang diuji harus dalam kisaran $0,1 \times K_d$ sampai $10 \times K_d$ untuk radioligand. Kapan radioligand terikat vs bebas diplot untuk reaksi bimolekuler sederhana, kurva hiperbolik diamati. Konsentrasi radioligand yang memberikan ikatan spesifik maksimal didefinisikan sebagai $K_{d\text{nilai}}$ dan digunakan sebagai parameter afinitas radioligand untuk reseptor. Sebuah isoterm saturasi representatif ditunjukkan pada Gambar 38.



Gambar 39. Data pengikatan saturasi radioligand representatif untuk single populasi reseptor

Untuk menentukan nilai eksperimen untuk K_d dan B_{maks} , data pengikatan saturasi sering dikenai analisis *Scatchard*. Dalam hal ini, nilai radioligand terikat/bebas vs terikat masing-masing diplot pada sumbu y dan x (Gambar 39). Plot linier umumnya diamati untuk radioligand yang mengikat ke populasi tunggal situs pengikatan yang sesuai dengan hukum sederhana aksi massa. Kemiringan plot *Scatchard* memberikan perkiraan radioligand K_d dan x-intercept memberikan perkiraan kepadatan reseptor atau $B_{maksimal}$. Plot *Scatchard Curvilinear* mungkin menunjukkan kooperatifitas atau beberapa populasi situs pengikatan (Gambar 40). Untuk interpretasi plot *Scatchard* kurvilinear dan diskusi tentang asumsi dan kemungkinan artefak yang terkait dengan transformasi *Scatchard* dari data isoterm saturasi, pembaca didorong untuk membaca buku bagus yang ditulis oleh Limbird, 1986. Metode yang lebih sederhana untuk menurunkan nilai K_d dan $B_{maksimal}$ adalah dengan menggunakan analisis regresi nonlinier yang disediakan oleh paket perangkat lunak yang disebut Prism. Prism juga memungkinkan pemasangan data ke satu dan dua persamaan pengikatan situs untuk menentukan apakah data saturasi paling cocok dengan satu atau dua populasi situs pengikatan.

Evaluasi tertutup dari nilai eksperimen K_d dan B maksimal penting dalam mengembangkan uji pengikatan radioligand. Radioligand K_d yang ditentukan secara eksperimental seharusnya mendekati nilai yang diharapkan yang dicantumkan oleh pemasok radioligan dan harus serupa dengan potensi ligan yang berasal dari studi fungsional (kecuali ada reseptor cadangan). Nilai B_{maks} juga harus berada dalam batas yang diharapkan untuk jaringan, preparasi membran, atau sel yang dipelajari. Nilai A B_{maks} lebih tinggi dari yang diharapkan untuk sel atau membran dapat menyarankan bahwa sebagian dari pengikatan radioligand yang diukur bukan karena pengikatan pada reseptor fisiologis yang diinginkan.



Gambar 40. Transformasi scatchard dari data pengikatan saturasi, satu populasi situs pengikatan.

Dua percobaan saturasi independen untuk $[^{125}\text{I}]\text{IL-8}$ yang

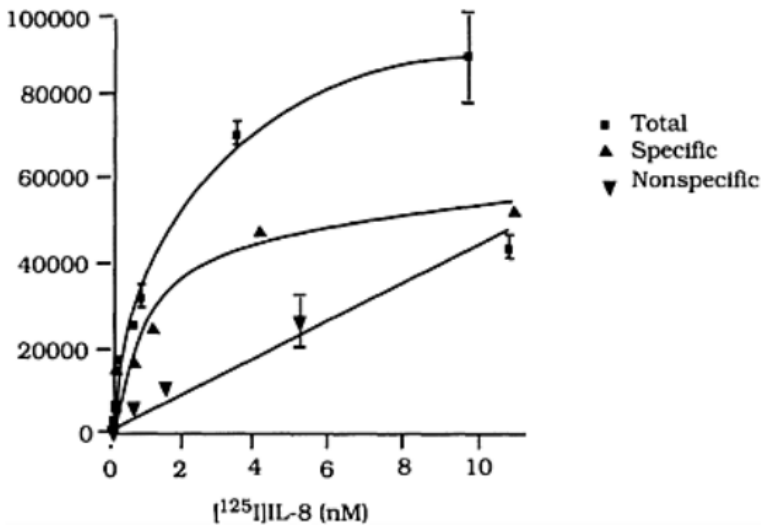
mengikat membran neutrofil manusia dilakukan selama pengembangan pengujian dan isotherm saturasi yang representatif ditunjukkan pada Gambar 41. Perkiraan untuk nilai K_d dan $B_{maksimal}$ $0,9 \pm 0,1$ nM dan 150-300 fmol/mg protein ditentukan menggunakan program Prism. Data juga cocok dengan model dua situs tetapi data ditemukan paling sesuai dengan model pengikatan satu situs. Nilai K_d yang diperoleh sesuai dengan nilai yang dilaporkan dalam literatur untuk studi pengikatan sel utuh tetapi urutan besarnya lebih rendah dari nilai yang dilaporkan dari penelitian yang menggunakan membran leukosit polimorfonuklear manusia.

5.6 Studi Persaingan

Spesifisitas radioligand berinteraksi dengan reseptor biasanya ditentukan oleh studi kompetisi. Dalam studi ini, persiapan membran atau sel diinkubasi dengan konsentrasi radioligand yang konstan dan peningkatan konsentrasi pesaing yang tidak berlabel. Untuk setiap reseptor yang diberikan, studi kompetisi yang terperinci harus dilakukan untuk menunjukkan bahwa selektivitas ligan yang diharapkan untuk reseptor ditunjukkan untuk berbagai agonis dan antagonis reseptor yang relevan. Umumnya, data pengikatan kompetisi diplot sebagai pengikatan spesifik vs \log_{10} dari konsentrasi pesaing. Sekali lagi, potensi senyawa yang bersaing untuk menghambat pengikatan

radioligand harus berkorelasi dengan kemampuan untuk mempromosikan (jika itu adalah agonis) atau menghambat (jika itu adalah antagonis) munculnya respons fisiologis yang terkait dengan reseptor.

Untuk mengukur potensi senyawa yang bersaing untuk situs pengikatan radioligand, satu menentukan konsentrasi senyawa bersaing yang mengurangi pengikatan radioligand sebesar 50%. Konsentrasi ini disebut sebagai IC_{50} , yang dapat ditentukan dengan analisis regresi nonlinier menggunakan paket perangkat lunak komputer yang sesuai seperti Prism. Setelah nilai IC_{50} telah ditentukan, konstanta disosiasi kesetimbangan untuk pesaing dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan Cheng-Prussoff:



Gambar 41. Ikatan saturasi [¹²⁵I]IL-8 ke membran neutrofil manusia. Pengujian mengandung 30 mg membran dan inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Titik data mewakili mean \pm SEM dari penentuan rangkap tiga di setiap [125 konsentrasi I] IL-8

$$K_{DI} = IC_{50} / (1 + [*DR] / K_D)$$

K_{DI} = konstanta disosiasi kesetimbangan untuk pesaing, I dan

K_D = konstanta disosiasi kesetimbangan untuk radioligan

Asumsi utama untuk penggunaan persamaan Cheng Prusoff adalah bahwa $[R] \ll K_D$ dari radioligan sedemikian rupa sehingga $[*D]$ ditambahkan = $[*D]$ bebas. Namun, dalam kasus tertentu jumlah radioligand tambahan yang mengikat reseptor

mungkin lebih besar dari 5%. Ini dapat dengan mudah menjadi kasus dalam pengujian dimana konsentrasi reseptor di dalam membran tinggi dan konsentrasi radioligan yang ditambahkan memiliki besaran yang sama. Persamaan alternatif telah diusulkan oleh Linden (1982) untuk situasi ini di mana lebih besar dari 5% ditambahkan radioligand terikat:

$$K_1 = \frac{[I]}{1 + \frac{[D]}{K_D} + \frac{R_{TOT}}{K_D} \left[\frac{[K_D] + [D]/2}{K_D + [D]} \right]}$$

Dimana R_{TOT} =konsentrasi yang dihitung dari situs pengikatan

Penting untuk secara hati-hati mengevaluasi bentuk kurva persaingan selama pengembangan dan validasi pengujian. Untuk kompetisi di mana satu populasi reseptor terlibat, kurva kompetisi akan melanjutkan dari 10% hingga 90% penghambatan pengikatan radioligand pada konsentrasi 81 kali lipat dari senyawa yang bersaing. Kurva yang lebih dangkal dan berlanjut dari 10% hingga 90% di atas kisaran pesaing yang lebih besar dari 81 kali lipat, memiliki bentuk yang lebih dangkal yang mungkin menunjukkan kooperativitas negatif atau interaksi dengan beberapa populasi situs pengikatan. Sebaliknya, senyawa pesaing yang mengurangi pengikatan radioligand dari 10% menjadi 90% dalam rentang

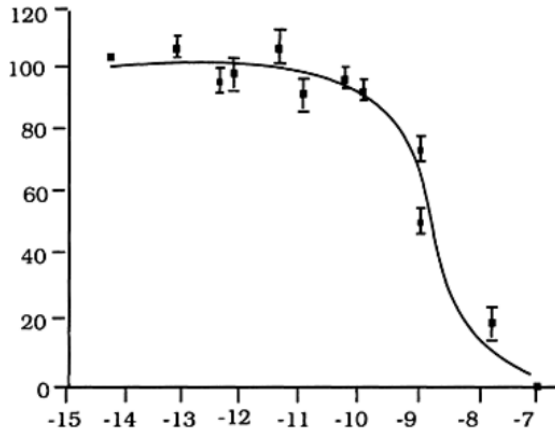
konsentrasi kurang dari 81 kali lipat, akan memiliki bentuk yang lebih curam yang menunjukkan kemungkinan kooperatif positif. Salah satu parameter yang biasa dihitung untuk mengukur bentuk kurva persaingan adalah koefisien pseudo-Hill.

Paket perangkat lunak komputer seperti Prism dapat digunakan untuk menghitung koefisien ini. Kurva kompetisi kecuraman normal akan memiliki koefisien pseudo-Hill 1, kurva dangkal akan memiliki koefisien pseudo-Hill kurang dari 1, dan kurva curam akan memiliki koefisien pseudo-Hill lebih besar dari 1. Penting untuk ditekankan bahwa inkubasi selama eksperimen kompetisi harus cukup tidak hanya untuk pengikatan radioligand untuk mencapai keseimbangan tetapi juga cukup untuk senyawa yang bersaing untuk mencapai keseimbangan. Jika kondisi ini tidak terpenuhi, penyimpangan dari kurva persaingan kecuraman normal dapat terjadi saat digunakan untuk menghitung koefisien ini.

Beberapa eksperimen kompetisi dilakukan selama pengembangan uji [¹²⁵I] IL-8. Data dari tiga percobaan dikumpulkan dan hasilnya ditunjukkan pada Gambar 42. Data persaingan paling cocok untuk persamaan persaingan satu situs menggunakan program kuadrat terkecil nonlinier Prism. Pengurangan pengikatan radioligand terjadi pada kira-kira dua unit log seperti yang diharapkan untuk model pengikatan satu situs sederhana. Sebuah IC₅₀ nilai 1,23±0.2 nM ditentukan yang sesuai dengan data saturasi. Beberapa sitokin lain dievaluasi

kemampuannya untuk bersaing dalam pengikatan [¹²⁵I]IL-8 ke membran neutrofil. Konsentrasi jenuh IL-3, IL-5, IL-6, GM-CSF, FMLP, dan C5a tidak memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pengikatan [¹²⁵I]IL-8 seperti yang diharapkan (data tidak ditampilkan).

Karena reseptor IL-8 adalah anggota dari tujuh superfamili reseptor transmembran, pengikatan agonis harus dikurangi dengan penambahan nukleotida guanin eksogen. Penambahan analog GTP nonhydrolyzable, GMP-PNP, diamati untuk mengurangi [¹²⁵I]IL-8 mengikat membran neutrofil manusia. Namun, hanya 60% pengikatan agonis berkurang menunjukkan bahwa subpopulasi reseptor IL-8 mungkin tidak berpasangan dengan protein-G atau membran mengandung populasi reseptor yang lebih besar daripada protein G (Gambar 43). Efek serupa dari nukleotida guanin pada [¹²⁵I]IL-8 yang mengikat membran PMN manusia telah dilaporkan dalam literatur (Barnett dkk., 1993).

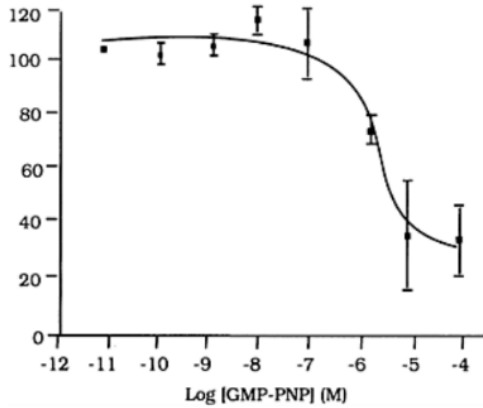


Gambar 42. Kompetisi IL-8 untuk [¹²⁵I]IL-8 mengikat neutrofil manusia membran. 1nM [¹²⁵I] IL-8 dan 30 g membran hadir dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang dengan menunjukkan konsentrasi IL-8. Titik data mewakili rata-rata+/-SEM data dari tiga percobaan terpisah di mana penentuan rangkap tiga dibuat pada setiap konsentrasi IL-8

Mirip dengan kebanyakan uji pengikatan radioligand, pengikatan IL-8 ke membran neutrofil manusia tidak terpengaruh oleh konsentrasi tinggi DMSO. Konsentrasi uji akhir hingga 10% DMSO tidak memiliki pengaruh yang signifikan pada pengikatan [¹²⁵I] IL-8 (data tidak ditampilkan).

5.7 Uji Pengikatan Radioligand Alternatif

Meskipun pengujian pengikatan radioligand filtrasi telah banyak digunakan untuk penemuan obat, teknologi pengujian baru telah dikembangkan secara komersial untuk menyederhanakan pengujian pengikatan radioligand dengan menghilangkan kebutuhan untuk memisahkan radioligand bebas dan terikat secara fisik. Uji keluaran baru yang lebih tinggi ini banyak digunakan oleh perusahaan farmasi dan bioteknologi dan sebagian besar menggantikan uji pengikatan radioligand filtrasi standar dalam program skrining. Sangat sedikit informasi yang tersedia mengenai kesesuaian uji baru ini untuk skrining ekstrak produk alami mentah. Oleh karena itu, kesesuaian ini perlu dinilai secara hati-hati untuk berbagai jenis ekstrak produk alami. Bagian berikut berisi beberapa metode pengujian baru ini dan mencakup diskusi prinsip-prinsip dasar, keuntungan dan kerugian penggunaan dalam skrining, bagaimana mereka dilakukan, dan instrumentasi khusus yang diperlukan untuk penggunaannya.



Gambar 43. Pengaruh GMP-PNP pada $[^{125}\text{I}]$ IL-8 mengikat membran neutrofil manusia. Pengujian mengandung 1 nM $[^{125}\text{I}]$ IL8, 30 g membran dan konsentrasi terindikasi dari GMP-PNP dan inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Data mewakili mean \pm SEM untuk penentuan rangkap tiga pada setiap konsentrasi GMP-PNP

5.8 Pengujian *FlashPlate*

Teknologi *FlashPlate*TM yang dikembangkan oleh Dupont-NEN, dapat digunakan untuk meningkatkan hasil uji pengikatan radioligand reseptor dalam program skrining. *FlashPlate*TM terutama terdiri dari pelat mikrotiter 96 sumur yang telah dilapisi sebelumnya dengan *scintillant* khusus. Prinsip pengujian adalah bahwa reseptor menjadi tergabung ke dalam fase *scintillant*, radioligand berikatan dengan reseptor, dan hanya radioligand terikat yang terkait dengan reseptor yang tergabung ke dalam *scintillant* yang akan berkontribusi pada sinyal pengujian. Membran (dengan kepadatan reseptor 10 fmol/sumur atau lebih besar) atau reseptor terlarut yang dimurnikan secara teoritis dapat digunakan dalam uji pengikatan radioligand *FlashPlate*TM. Pemuatan reseptor murni ke dalam fase *scintillant* jauh lebih efisien daripada pemuatan membran. Namun, dua masalah potensial dapat terjadi dengan penggunaan reseptor yang dimurnikan. Asosiasi dengan polistiren dapat menonaktifkan reseptor atau dapat menyebabkan hambatan sterik untuk situs pengikatan reseptor.

Masalah-masalah ini terkadang dapat dihindari dengan melapisi *FlashPlates*TM dengan antisera non-penetrasi ke reseptor diikuti dengan pemuatan reseptor. Direkomendasikan bahwa ligan radioiodinasi digunakan pada awalnya dan kemudian radioligan *tritiated* dapat diuji dan mungkin diganti jika rasio sinyal

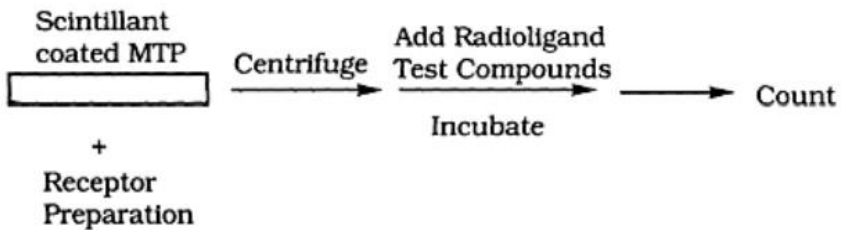
kebisingan yang cukup diperoleh. Untuk beberapa reseptor, dimungkinkan untuk menggunakan FlashPlate™ sebagai wadah reaksi dan sentrifugasi FlashPlate™ dengan kecepatan rendah untuk mengumpulkan reseptor ke dinding plate atau dibiarkan mengendap sebelum menghitung. Penghitungan efisiensi untuk radioisotop yang berbeda menggunakan FlashPlate™ lebih rendah dibandingkan dengan penghitungan kilau tradisional,

Uji pengikatan radioligand menggunakan FlashPlate™ biasanya terdiri dari langkah-langkah pengujian berikut (Gambar44).

1. Pertama, persiapan reseptor dimasukkan ke dalam pelat berlapis kilau dengan sentrifugasi diikuti dengan pencucian untuk menghilangkan reseptor yang tidak tergabung.
2. Pengujian dimulai dengan penambahan radioligand dan ekstrak uji diikuti dengan inkubasi yang cukup.
3. Dalam beberapa kasus, campuran reaksi dihilangkan dengan aspirasi sebelum penghitungan. Ini akan disarankan dalam skrining ekstrak produk alami karena penghilangan ekstrak akan mengurangi potensi pendinginan ekstrak.
4. Pelat kemudian dihitung menggunakan baik Packard TopCount atau penghitung kilau pelat mikrotiter Wallac MicroBeta.

Manfaat utama menggunakan FlashPlate™ untuk uji pengikatan radioligand meliputi: Format pelat mikrotiter 96 sumur yang dapat diotomatisasi, penghapusan langkah-langkah skrining

dan penambahan kilau, pengurangan volume pengujian dan limbah radioaktif, dan penghitungan yang lebih cepat dalam penghitung kilau pelat mikrotiter. Kelemahan utama penggunaan FlashPlates™ adalah pengurangan sinyal terhadap rasio kebisingan dibandingkan dengan uji pengikatan filtrasi standar yang menggunakan penghitung kilau standar. Karena itu, FlashPlate™ paling baik digunakan untuk preparasi reseptor di mana densitas reseptornya tinggi. Selain itu, sinyal kebisingan jauh lebih baik menggunakan ligan radioiodinasi aktivitas spesifik tinggi daripada radioligan *tritiated*. Contoh penggunaan FlashPlate™ untuk pengikatan uji radioligand reseptor telah dilaporkan untuk reseptor endotelin A dan B menggunakan ligan peptida radioiodinasi.



Gambar 44. Langkah-Langkah Uji Pengikatan Radioligand FlashPlate

Peralatan utama yang diperlukan untuk skrining throughput tinggi menggunakan FlashPlates™ meliputi:

- Sentrifugasi pelat mikrotiter
- Perangkat penanganan cairan otomatis (opsional)
- Penghitung kilau pelat mikrotiter (*Wallac MicroBeta* atau *Packard Top Count*)
- Lengan robot untuk manipulasi pelat (opsional)

5.9 Uji Kedekatan Kilauan

Amersham telah mengembangkan teknologi yang menghasilkan dua penyederhanaan uji pengikatan radioligan reseptor. Teknologi ini disebut sebagai uji “*Scintillation Proximity™*” (SPA). Komponen kunci dari uji SPA adalah fluoromikrosfer kecil yang mengandung *scintillant*. Molekul radioaktif yang dibawa ke dekat manik-manik merangsang kilau untuk memancarkan cahaya yang dapat diukur dalam penghitung kilau pelat mikrotiter. Ligan radioaktif yang terlalu jauh dari *scintillant* tidak berkontribusi pada sinyal. Mayoritas uji SPA menggunakan persiapan membran reseptor yang mengikat manik-manik SPA gandum aglutinin (WGA). Uji SPA terdiri dari langkah-langkah berikut (Gambar45):

1. Ligan berlabel [^3H]- atau [^{125}I]- ditambahkan ke dalam sumur pelat mikrotiter. Uji inkubasi dimulai dengan penambahan membran.
2. Manik-manik SPA berlapis antibodi WGA- atau anti-reseptor-spesifik ditambahkan diikuti oleh periode inkubasi lain.
3. Pelat kemudian dihitung dalam *scintillation counter* plat mikrotiter.

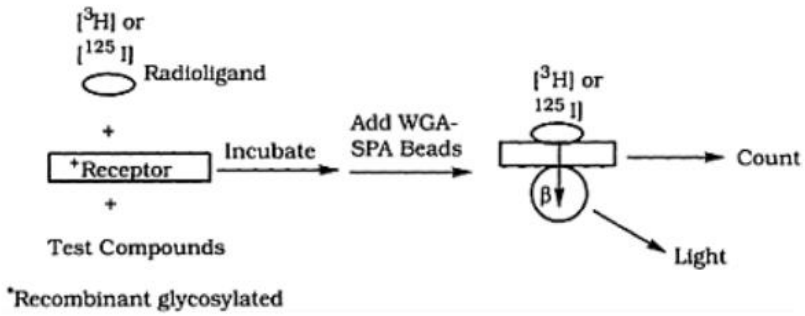
Keuntungan dari uji SPA reseptor homogen meliputi; format pelat mikrotiter 96 sumur, penghilangan langkah filtrasi dan adisi sintilan, dan reduksi limbah radioaktif. Keterbatasan uji SPA

mencakup penggunaan hanya ligan berlabel [^3H]- atau [^{125}I] dan rasio sinyal kebisingan yang lebih rendah daripada yang diamati dengan uji pengikatan filtrasi radioligan standar. Kit uji yang tersedia secara komersial untuk reseptor angiotensin, endotelin, aktor pertumbuhan fibroblast, NPY, dan IL6 telah dikembangkan oleh Amersham dan telah digunakan dalam program skrining reseptor keluaran tinggi menggunakan ekstrak produk alami. Semua kit uji ini menggunakan ligan radioiodinasi.

Teknologi SPA juga berfungsi untuk ligan berlabel [^3H]-, tetapi membutuhkan membran yang mengandung reseptor dengan kepadatan tinggi. Pendinginan uji sinyal dapat terjadi dengan ekstrak produk alami dan dapat dikoreksi dengan menggunakan program yang disediakan oleh Amersham. Selain menjual kit tertentu, Amersham juga menawarkan pengaturan alih teknologi dengan perusahaan farmasi dan bioteknologi. Beberapa dokumen yang menjelaskan penggunaan teknologi SPA untuk uji pengikatan reseptor telah diterbitkan.

Peralatan utama yang diperlukan untuk skrining throughput tinggi menggunakan FlashPlatesTM meliputi:

- Perangkat penanganan cairan otomatis (opsional)
- Penghitung kilau pelat mikrotiter (*Wallac MicroBeta* atau *Packard Top Count*)
- Lengan robot untuk manipulasi pelat (opsional)



Gambar 45. Langkah-Langkah Uji Pengikatan Reseptor SPA

5.10 Uji Pelat *ScintiStrip*

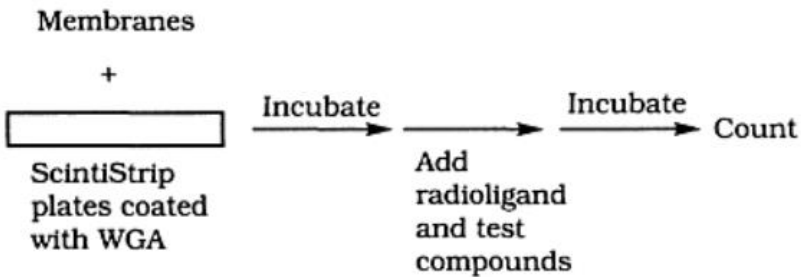
Wallac telah mengembangkan pelat mikrotiter habis pakai dimana *scintillant* dimasukkan ke dalam plastik polistirena di dalam pelat mikrotiter. Pelat ini disebut pelat “ScintiStrip™” dan dapat dilapisi dengan beberapa bahan termasuk antibodi reseptor, WGA, dan streptavidin. Mirip dengan FlashPlates™, hanya radioligand terikat reseptor yang terkait dengan *scintillant* yang berkontribusi pada sinyal pengujian. Well-to-well-cross-talk terjadi dengan pelat ScintiStrip™ karena transparan dan Wallac memiliki pengembangan program cross-talk yang memungkinkan koreksi kontribusi cross-talk dari well-to-well ke sinyal pengujian.

Pelat ScintiStrip™ menawarkan keuntungan sebagai berikut: pelat tersebut disusun dalam format pelat mikrotiter 96 sumur, tidak diperlukan langkah skrining dan penambahan kilau, limbah radioaktif diminimalkan, dan beberapa radioisotop yang berbeda dapat digunakan. Kepadatan reseptor mungkin menjadi masalah dengan penggunaan pelat ini, terutama dengan ligan [³H]. Sinyal kebisingan juga berkurang karena koreksi cross talk dari well-to-well.

Langkah-langkah yang terkait dengan uji pengikatan radioligand pelat ScintiStrip yang representatif adalah sebagai berikut:

1. Pelat dilapisi dengan WGA
2. Membran yang mengandung reseptor ditambahkan dan pelat diinkubasi untuk memungkinkan interaksi reseptor-WGA berlangsung.
3. Radioligan dan ekstrak uji ditambahkan dan pelat diinkubasi hingga keadaan tunak.
4. Tergantung pada radioligand, reaksi dapat diaspirasi dan pelat dihitung dalam penghitung kilau pelat mikro.

Gambar 46 berisi langkah-langkah yang akan dikaitkan dengan uji pengikatan reseptor tipikal yang menggunakan pelat membran ScintiStrip™. Dalam contoh ini, pelat dilapisi dengan WGA untuk mempromosikan interaksi reseptor glikosilasi dalam membran dengan pelat dengan baik.



Gambar 46. Langkah-langkah pengujian yang terkait dengan pengujian pengikatan reseptor ScintiStrip™

Peralatan utama yang diperlukan untuk penggunaan ScintiStrip Plates™ untuk pengikatan radioligand meliputi:

- Perangkat penanganan cairan otomatis (opsional)
- Penghitung kilau pelat mikrotiter (khusus Wallac MicroBeta)
- Lengan robot untuk manipulasi pelat (opsional)

5.11 Pengikatan Reseptor Berbasis Fluoresensi

Salah satu perkembangan penting mengenai pengujian reseptor keluaran tinggi adalah peningkatan minat dalam pengujian berbasis fluoresensi. Pengembangan uji pengikatan reseptor homogen yang menggunakan ligan fluoresen akan menjadi area penelitian dan pengembangan yang intensif oleh sejumlah perusahaan yang berbeda dalam waktu dekat. Deteksi fluoresensi bisa menjadi sangat sensitif: senyawa dapat tereksitasi hingga 200.000 detik untuk menghasilkan jumlah foton yang dipancarkan hampir sama. Salah satu masalah potensial dengan deteksi fluoresensi adalah bahwa kebisingan latar belakang bisa sangat hebat. Kemajuan yang dicapai dalam bidang ini dibahas pada bagian berikut.

Fluoresensi yang Diselesaikan dengan Waktu

Pada dasarnya, fluoresensi yang diselesaikan dengan waktu didasarkan pada penggunaan label khelat lantanida dengan sifat fluoresensi yang unik. Sifat-sifat ini mencakup masa pakai fluoresensi yang panjang dari sinyal fluoresensi yang memungkinkan pengukuran label fluoresensi lama setelah fluoresensi latar belakang menurun. Label kelat lantanida juga memiliki perbedaan besar antara panjang gelombang eksitasi dan emisi yang juga menghasilkan rasio sinyal kebisingan yang besar. Transfer energi kelat lantanida yang ditingkatkan seperti kelat europium, terbium, samarium, dan disprosium memiliki sifat ini dan telah digunakan untuk beberapa waktu dalam pengukuran fluoresensi yang diselesaikan.

Fluoresensi yang diselesaikan dengan waktu telah banyak digunakan untuk immunoassay, deteksi probe DNA dan uji sitotoksitas. Teknik ini belum banyak diterapkan pada pengukuran pengikatan ligan-reseptor tetapi satu kelompok telah melaporkan pengukuran pengikatan ligan ke membran yang mengandung reseptor benzodiazepin menggunakan ligan berlabel europium sebagai pelacak dalam uji pengikatan kompetitif. Ligan yang terikat diukur dari pelet membran yang disentrifugasi setelah resuspensi menjadi solusi peningkatan khusus. Pengukuran kompleks reseptor-ligan yang dipanen dengan filtrasi, menggunakan fluoresensi yang diselesaikan dengan waktu, membutuhkan penggunaan label khelat yang sangat stabil dan

matriks filter khusus dengan latar belakang luminesensi rendah. Diperkirakan bahwa perkembangan teknologi baru akan mengarah pada penerapan lebih lanjut dari fluoresensi yang diselesaikan dengan waktu untuk membangun uji pengikatan reseptor homogen berbasis fluoresensi yang sensitive.

Polarisasi Fluoresensi

Polarisasi fluoresensi adalah metode uji homogen yang relatif baru yang dapat digunakan untuk mengevaluasi interaksi protein-protein seperti pengikatan ligan peptida ke reseptor peptida. Fitur mendasar dari teknologi ini adalah dapat digunakan untuk mengevaluasi pengikatan molekul yang lebih kecil ke molekul yang lebih besar. Ini juga dapat digunakan untuk menentukan berat molekul suatu molekul dan telah digunakan sebagai sistem uji homogen untuk protease. Dasar-dasar cara kerja polarisasi fluoresensi adalah sebagai berikut. Molekul fluoresen dapat dianggap memiliki sumbu tertentu yang arahnya dapat dibandingkan dengan arah vektor listrik yang terkait dengan penyerapan (eksitasi). Polarisasi positif terjadi ketika molekul menyerap dan memancarkan cahaya dalam arah yang dapat dianggap sejajar satu sama lain. Dalam kondisi seperti itu, eksitasi dengan cahaya terpolarisasi vertikal (terpolarisasi sepanjang sumbu y) menghasilkan fluoresensi yang memiliki intensitas terbesar di sepanjang sumbu y . Detektor polarisasi fluoresensi digunakan untuk mengambil dua pembacaan intensitas

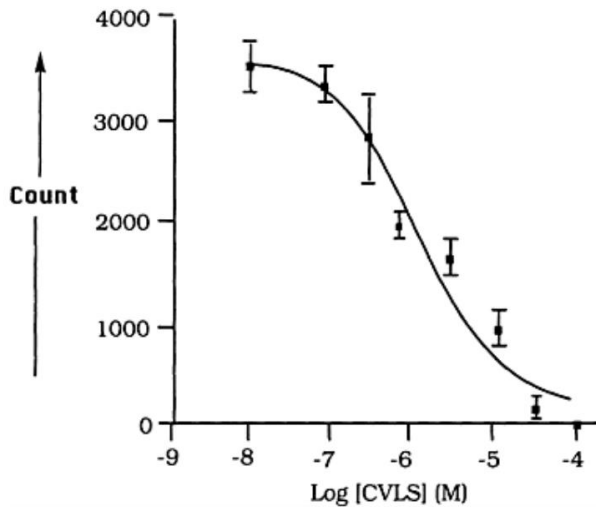
fluoresensi, satu dengan penganalisis dipegang secara vertikal dan yang lainnya dipegang secara horizontal. Polarisasi didefinisikan sebagai perbedaan dua intensitas yang diamati atas jumlah mereka. Polarisasi juga merupakan fungsi rotasi molekul. Semakin kecil suatu molekul, semakin cepat ia berputar dan polarisasi fluoresensi akan semakin rendah. *Jolley Consulting and Research*, telah mengembangkan polarimeter fluoresensi pelat mikrotiter yang dapat digunakan untuk pengukuran polarisasi fluoresensi berbasis pelat mikrotiter dan yang digunakan dalam program skrining obat dengan keluaran tinggi. Beberapa laboratorium telah menggunakan polarisasi fluoresensi untuk pengukuran pengikatan ligan ke reseptor termasuk pengikatan fluorescent berlabel EGF, glukagon berlabel fluoresen, neurokinin berlabel fluoresen ke reseptor perspektif mereka. Pertimbangan penting untuk aplikasi ini termasuk persyaratan untuk pelacak fluoresen yang sangat murni yang diberi label dengan bagian fluoresen pada posisi yang tepat. Uji polarisasi fluoresensi dapat menghasilkan keluaran yang sangat tinggi dan memberikan rasio sinyal kebisingan yang sangat baik. Meskipun teknologi ini relatif baru, diharapkan akan semakin banyak digunakan untuk pengujian reseptor.

**BAB VI.
BEBERAPA BIOASSAY
BERBASIS ENZIM IN
VITRO UMUM**



6.1 Uji Penghambatan Protease

Protease atau proteinase adalah enzim proteolitik yang berperan penting dalam fungsi fisiologis normal sel misalnya pematangan protein, pencernaan, pembekuan darah, kontrol tekanan darah, respon imun, dll. Berbagai penyakit seperti kanker, emfisema paru, otot distrofi, radang sendi, pankreatitis, dll dikaitkan dengan aktivitas protease yang berlebihan. Oleh karena itu, peran protease dalam penyakit memberikan target untuk kemungkinan pengobatan berbagai penyakit dengan proteas inhibitor sebagai agen terapeutik dari sumber alami.



Gambar 47. Kompetisi CVLS untuk farnesilasi biotinil-lamin. Pengujian mengandung konsentrasi akhir enzim 1 mg, 10 mM [^3H]-FPP, 70 nM biotinil-lamin, dan menunjukkan konsentrasi CVLS; inkubasi dilakukan selama 60 menit pada suhu ruang. Titik data, yang mewakili rata-rata \pm -SEM dari penentuan rangkap tiga, dibuat/pada konsentrasi CVLS yang ditunjukkan. Kurva mewakili kecocokan data ke persamaan persaingan satu situs menggunakan program pemasangan kurva kuadrat terkecil nonlinier, Prism.

1. Protease dan substrat kromogenik spesifiknya:

Protease	Substrat	
i	α -Chymotrypsin	N-Suc-phe-p-nitroanilide
ii	Trypsin	Bz-DL-Arg-p-nitroanilide
iii	Elastase	Suc-(Ala) $_3$ -p-

		nitroanilide
iv	Carboxypeptidase A	Hippuryl-L-phenylalanine
v	Papain	Bz-DL-Arg-p-nitroanilide

Bahan:

1. Tris (hidroksimetil) aminometana
2. Buffer A (pH 7,5): Tris-HCl (1M), NaCl (0,5M)
3. Buffer B (pH 8,6): Tris-HCl (0,4 M), MgCl₂(5 mM)
4. Buffer C (pH 7,5): Tris-HCl (50 mM), L-Cysteinium klorida (1mM), EDTA.Na₂ (2 mM)
5. Litium klorida (10% b/v)
6. DMSO
7. HCl(5M)
8. Labu volumetrik
9. Pengukur Silinder
10. Gelas beaker
11. Mikropipet
12. pH meter
13. Spektrofotometer UV/Vis
14. Air deionisasi
15. *Timer/stopwatch*
16. Tabung Eppendorf (bersilikon)
17. Mikroplat sumur 96 (dasar datar)

18. Pembaca mikroplat
19. Sampel uji (ekstrak mentah, senyawa alami atau sintetis murni)

Prinsip: Substrat kromogenik protease memiliki urutan asam amino spesifik yang terkait dengan kromofor, seperti: p-nitroanilin. Tindakan protease spesifik pada substratnya menyebabkan pelepasan kromofor yang diukur sebagai peningkatan absorbansi dalam spektrofotometer. Oleh karena itu, jumlah kromofor yang dibebaskan sebanding dengan aktivitas enzim.

a) Persiapan Pelarut:

1) Buffer Tris-HCl

Sebanyak 121,14 gram Tris (hidroksimetil)-aminometana dilarutkan dalam air deionisasi. pH disesuaikan dengan nilai yang dibutuhkan dengan HCl (5 M), dan volume dibuat hingga 1 liter dengan air.

2. Buffer uji untuk protease:

Protease	Buffer	Konsentrasi Molar (M)	pH Buffer
1. α -Chymotrypsin	Tris-HCl	0.4	7.5
2. Trypsin	Tris-HCl	0.4	7.5

Protease	Buffer	Konsentrasi Molar (M)	pH Buffer
3. Elastase	Tris-HCl	0.4	8.6
4. Carboxypeptidase A	A	-	7.5
5. Leucine aminopeptidase	B	-	8.6
6. Papain	C	-	7.5

3. Protease dapat dilarutkan dalam buffer berikut:

Protease	Buffer	Konsentrasi (mM)	pH Buffer	Enzim (Units/ml)
1. α -Chymotrypsin	Tris-HCl	50	7.5	9.0
2. Trypsin	Tris-HCl	50	7.5	150
3. Elastase	Tris-HCl	50	8.6	0.6
4. Carboxypeptidase A	LiCl (10% b/v)	-	-	0.4

5. Leucine amino-peptidase	B	-	8.6	4.0
6. Papain	C	-	7.5	6.0

4. Larutan substrat dapat dilarutkan dalam buffer berikut:

Substrat	Buffer	Konsentrasi Molar (mM)	pH Buffer	Konsentrasi Substrat
1. N-Suc-Phe-p-nitroanilide	Tris-HCl	50	7.5	2.6
2. Bz-DL-Arg-p-nitroanilide	Tris-HCl	50	7.5	1.0
3. Suc (Ala) ³ -p-nitroanilide	Tris-HCl	50	8.6	1.55
4. Hippuryl-L-Phenylalanine	A	-	7.5	1.70

Substrat	Buffe r	Konsentra si Molar (mM)	pH Buffe r	Konsentra si Substrat
5. L-leucine-p-nitroanilid e	B	-	8.6	17.40

b) Prosedur Pengujian

Buffer uji 400 µl

Larutan enzim 100 µl

Sampel uji 1 ml

Larutan substrat 1,5 ml

1. 500 µl buffer uji ditempatkan dalam tabung reaksi yang bersih dan kering.
2. Ditambahkan 500 µl larutan enzim protease.
3. Ditambahkan 1,0 ml sampel uji diaduk homogen.
4. Campuran uji diinkubasi pada 37°C selama 30 menit.
5. Terakhir, 1,0 ml larutan substrat ditambahkan dan absorbansi dimonitoring terus-menerus dalam spektrofotometer selama 15 menit pada panjang gelombang yang sesuai (410 nm untuk semua substrat kecuali untuk hippuryl-L-phenylalanine, pada panjang gelombang 254 nm).

Prosedur Uji Microplate Sumur 96:

1. 50 µl buffer uji dibagi pada setiap mikroplat sumur 96 dasar datar.
2. Ditambahkan 50 µl larutan enzim protease.
3. 100 µl sampel uji ditambahkan dan dicampur.
4. Campuran uji diinkubasi pada 37°C selama 30 menit dalam mikroplate *reader*
5. 100 µl larutan substrat dikeluarkan dan absorbansi dilihat terus-menerus dalam mikroplate *reader* selama 15 menit dengan panjang gelombang yang sesuai.

(Catatan: Pelarut organik yang digunakan untuk melarutkan sampel uji dapat mempengaruhi aktivitas enzim).

Kontrol harus dijalankan untuk mengukur perubahan aktivitas enzim. Kontrol positif juga harus dijalankan dengan inhibitor standar yang sesuai. Kondisi pengujian harus disemprot sedemikian rupa sehingga jumlah maksimum sampel uji harus ditambahkan ke setiap pengujian dengan jumlah minimum pelarut organik. Meskipun banyak pelarut organik dapat digunakan tetapi DMSO adalah salah satu yang paling nyaman karena dapat larut dalam air dan secara langsung kompatibel dengan sistem pengujian ini.

Perhitungan Persentase Inhibisi:

Persentase penghambatan aktivitas enzim setelah inkubasi dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

6.2 Uji Penghambatan Tirosinase

Tirosinase adalah enzim yang bertanggung jawab untuk sintesis pigmen melanin dermal dari Tyrosine dan L-DOPA (dihidroksifenilalanin) dalam melanosit pada melanosom. Ini memiliki beberapa fungsi termasuk hidrosilasi L-tirosin dan oksidasi L-DOPA menjadi dopaquinone dan autopolimerisasi selanjutnya menjadi melanin. Produksi melanin yang berlebihan telah dikaitkan dengan kondisi hiperpigmentasi pada kulit seperti melasma dan ephelides. Oleh karena itu, penghambatan enzim tirosinase efektif untuk mengendalikan hiperpigmentasi dan kondisi terkait.

Bahan:

1. Buffer fosfat (0.1 M, pH 6.8)
2. L-3,4,-Dihidroksifenilalanin (L-DOPA)
3. L-tirosin
4. Enzim jamur tirosinase
5. DMSO
6. Labu volumetrik
7. Pengukur silinder

8. Gelas beaker
9. Mikropipet
10. pH meter
11. Timer
12. *Waterbath*
13. Air deionisasi
14. Spektrofotometer UV/VIS
15. Tabung Eppendorf (bersilikon)
16. microplates sumur 96 (dasar datar)
17. *Mikroplate reader*
18. Sampel uji (ekstrak mentah, produk alam murni, atau senyawa sintetik)

Hidroksilat tirosinase pertama L-tirosin menjadi L-DOPA dan kemudian teroksidasi L-DOPA menjadi dopaquinone yang selanjutnya diubah menjadi dopachrome. Aktivitas enzim tirosinase sebanding dengan jumlah dopakrom yang dibebaskan yang diukur pada 475 nm dalam spektrofotometer.

Preparasi Larutan:

(a) Buffer Fosfat (0.1 M, pH 6.8)

(I) Larutan-A (0.2 M Na_2HPO_4)

Sebanyak 35,6 gram $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ dilarutkan dalam air dan volumenya dibuat menjadi 1 liter dengan air.

(II) Larutan-B (0.2 M, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

-Sebanyak 31,2 gram $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ dilarutkan dalam air

dan volumenya dibuat menjadi 1 liter dengan air.

-Diambil 51 ml larutan-B dicampur dengan 49 ml larutan-A dan ditambahkan air hingga 200 ml.

(b) Persiapan Larutan Enzim dan Substrat

Enzim	Dapar	Konsentrasi (M)	pH Buffer	Konsentrasi Enzim (units/ml)
Jamur Tirosinase	Fosfat	0.1	6.8	60

Substrat	Dapar	Konsentrasi (M)	pH Buffer	Konsentrasi Substrat (mM)
(i) L-DOPA	Fosfat	0.1	6.8	2.55
(ii) L-Tyrosine	Fosfat	0.1	6.8	1.70

Prosedur Pengujian

Dua jenis substrat dapat digunakan untuk pengujian ini:

(i) L-DOPA dan (ii) L-Tirosin

- (1) 1,0 ml dapar fosfat dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- (2) 500 µl larutan enzim tirosinase jamur ditambahkan.
- (3) 500 µl sampel uji ditambahkan, dicampur dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 10 menit.
- (4) 1,0 ml larutan substrat ditambahkan.
- (5) Absorbansi diamati terus-menerus dalam spektrofotometer pada panjang gelombang 475 nm, selama 20 menit.

Desain Uji Microplate Sumur 96:

- (1) 100 µl dapar fosfat dibagi pada tiap-tiap sumur dari mikroplate sumur 96.
- (2) 50 µl larutan enzim jamur tirosinase ditambahkan.
- (3) 50 µl sampel uji ditambahkan, dicampur dan diinkubasi pada suhu 25 ° C selama 10 menit.
- (4) 100 µl larutan substrat ditambahkan.
- (5) Absorbansi diamati terus-menerus dalam *mikroplate reader* pada 475 nm, selama 20 menit.

Perhitungan Persentase Inhibisi:

Persentase penghambatan aktivitas enzim dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

6.3 Uji Penghambatan Hyaluronidase

Hyaluronidase, enzim hidrolisis mukopolisakarida, telah terbukti terlibat dalam berbagai penyakit. Enzim ini secara fungsional berhubungan dengan permeabilitas vaskular dan reaksi inflamasi. Karena enzim ada dalam bentuk tidak aktif, aktivitas in vivo oleh ion logam termasuk ion kalsium berhubungan dengan degranulasi sel mast, menyebabkan pelepasan mediator yang menyebabkan alergi termasuk inflamasi. *Hyaluronate, mucopolysaccharide*, terdiri dari subunit berulang asam D-glucuronic dan Nacetyl-D-glucosamine, adalah agen pelumas kental hadir dalam cairan sinovial di sendi. Pada rheumatoid arthritis, degradasi berlebihan oleh hyaluronidase dapat menyebabkan penurunan jumlah dan berat molekul hyaluronate sehingga menghasilkan gejala arthritis. Pencarian inhibitor enzim hyaluronidase dapat mengarah pada isolasi obat anti-alergi dan anti-inflamasi baru yang kuat.

Bahan:

1. Buffer Asetat (0.1 M, pH 3.5)
Natrium asetat (0.1 M)
Asam asetat glasial (0.1 M)
2. Enzim Hyaluronidase (dari testis sapi)
3. Kalium hialuronat
4. Kalsium klorida (2.5 mM)

5. Natrium hidroksida (0.4 N)
6. Kalium tetraborat (0.8 N, pH 9.1 disesuaikan dengan 5 M KOH)
7. p-Dimetilaminobenzaldehida
8. Tabung reaksi tutup ulir (Pyrex)
9. Mikropipet
10. *Waterbath*
11. HCl (10N)
12. Timer
13. Spektrofotometer UV/VIS
14. pH meter
15. Labu volumetrik
16. Gelas beaker
17. Pengukuran silinder
18. Air deionisasi
19. Sampel uji (ekstrak mentah, produk alami murni atau senyawa sintetis)

Prinsip:

Enzim Hyaluronidase secara hidrolitik memotong ikatan β (1-4) dalam asam hialuronat, membebaskan produk dengan bagian terminal N-asetil-D-glukosamin yang bereaksi dengan alkali untuk membentuk senyawa antara glukoksazolin. Zat antara ini bereaksi dengan p-dimetilaminobenzaldehida untuk menghasilkan

produk berwarna yang diukur pada 585 nm.

1) Persiapan Buffer dan Larutan:

a) Buffer Asetat (0.1 M, pH 3.5)

(I) Bagian A:

Sebanyak 16,4 gram natrium asetat dilarutkan dalam air dan volumenya dibuat menjadi 1 liter dengan air.

(II) Bagian B:

-Sebanyak 11,55 ml asam asetat glasial dicampur dengan air dan dibuat volumenya menjadi 1 liter dengan air.

-Sebanyak 46,3 ml larutan-B dicampur dengan 3,7 ml larutan A dan ditambahkan air hingga 100 ml.

b) Pelarut untuk p-dimethylaminobenzaldehyde:

Sebanyak 12,5 ml HCl (10 N) di ad kan dengan asam asetat glasial sampai 100 ml.

c) p-Dimethylaminobenzaldehyde (67 mM)

Larutan stok:

p-DMAB (10 gram) dilarutkan dalam pelarut p-DMAB dan volume dibuat hingga 100 ml dengan pelarut yang sama. Sesaat sebelum digunakan, dipipet 1 ml larutan stok di ad dengan asam asetat glasial sampai 10 ml.

d) Pembuatan Larutan Enzim dan Substrat:

Enzim	Dapar	Konsentrasi Molar (M)	pH Dapar	Konsentrasi Enzim (N.F. Units/ml)
Hyaluronidase	Acetate	0.1	3.5	350

Substrat	Dapar	Konsentrasi Molar (M)	pH Dapar	Konsentrasi Substrat (mg/ml)
Kalium Hyaluronat	Acetate	0.1	3.5	1.2

Prosedur Pengujian

Aktivasi Enzim Hyaluronidase

(I) 400 μ l larutan enzim hyaluronidase (350 N.F.units/ml dapar asetat) dimasukkan ke dalam tabung reaksi tutup ulir.

(II) 100 μ l larutan CaCl_2 (2,5 mM dalam buffer asetat) ditambahkan ke tabung reaksi tersebut dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit, untuk mengaktifkan enzim.

Penghambatan Enzim Hyaluronidase yang Diaktifkan

(I) 100 μ l sampel uji atau pembawa ditambahkan ke enzim yang diaktifkan.

(II) Campuran ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit pada *waterbath*

(III) 500 µl kalium hialuronat (1,2 mg/ml buffer asetat) ditambahkan dan inkubasi dilakukan lagi pada 37°C selama 20 menit.

(IV) Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 100 µl NaOH (0,4 N) dan 100 µl kalium tetraborat (0.8 N, pH 9.1).

(V) Campuran dipanaskan dalam penangas air (*waterbath*) mendidih selama tepat 3 menit dan tabung didinginkan menggunakan air keran.

(VI) Sebanyak 3 ml larutan p -DMAB (67 mM) ditambahkan, dicampur, dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit, untuk menghasilkan warna.

(VII) Absorbansi campuran diukur pada 585 nm dalam spektrofotometer terhadap blanko.

Penghambatan Aktivasi Enzim Hyaluronidase Tidak Aktif

(I) Sebanyak 400µl larutan enzim hyaluronidase (350 N.F.units/ml dapar asetat) dimasukkan ke dalam tabung reaksi tutup ulir.

(II) Kemudian, 100µl sampel uji atau pembawa ditambahkan, dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit.

(III) Sebanyak 100 μl CaCl_2 (2.5 mM dalam buffer asetat) ditambahkan dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit.

(IV) 500 μl kalium hialuronat (1,2 mg/ml buffer asetat) ditambahkan dan inkubasi dilakukan lagi pada 37°C selama 20 menit.

(V) Reaksi enzim dihentikan dengan menambahkan 100 μl NaOH (0,4 N) dan 100 μl kalium tetraborat (0.8 N, pH 9.1).

(VI) Campuran dipanaskan dalam penangas air (waterbath) mendidih selama tepat 3 menit dan tabung didinginkan menggunakan air keran.

(VII) Sebanyak 3 ml larutan p -DMAB (67 mM) ditambahkan, dicampur, dan diinkubasi pada 37°C selama 20 menit, untuk menghasilkan warna.

(VIII) Absorbansi campuran diukur pada 585 nm dalam spektrofotometer terhadap blanko.

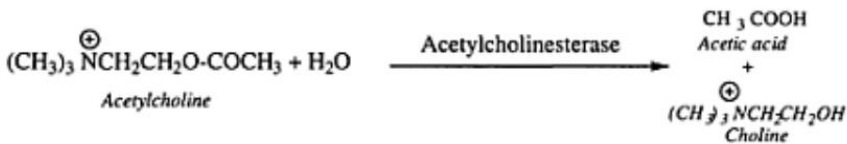
Perhitungan Persentase hambatan

Persentase penghambatan aktivitas enzim dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

6.4 Uji Penghambatan Acetylcholinesterase

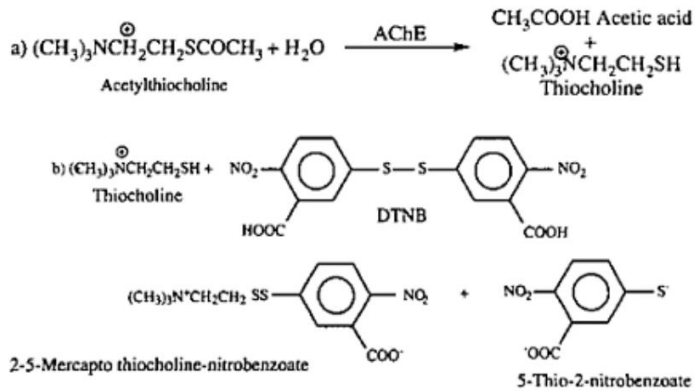
Acetylcholinesterase (acetylcholine acylhydrolase, EC 3.1.1.7) memiliki peran penting dalam sistem saraf pusat dan perifer, bersama dengan reseptor asetilkolin, dalam transmisi potensial aksi di sinapsis saraf-saraf dan neuromuskular. Tugas fisiologis enzim adalah penghancuran hidrolitik neurotransmitter kationik, asetilkolin.



Karena peran penting yang diberikan asetilkolinesterase (AChE) dalam sistem saraf, ia telah lama menjadi target yang menarik untuk desain rasional dan penemuan penghambat mekanisme. Beberapa inhibitor acetylcholinesterase diketahui berguna untuk pengobatan penyakit Alzheimer, pikun, ataksia, dan untuk meningkatkan ingatan jangka panjang dengan meningkatkan aktivitas kolinergik.

Uji Spektrofotometri

Prinsipnya melibatkan pengukuran laju produksi tiokolin, karena asetiltiokolin dihidrolisis oleh asetilkolinesterase. Hidrolisis asetiltiokolin disertai dengan reaksi kontinu antara tiokolin yang dibebaskan dan DTNB (asam dithiobisnitrobenzoat) yang menghasilkan anion kuning dari asam 5-tio-2-nitrobenzoat.



Laju produksi anion diukur dari absorbansi pada 412 nm.

Bahan:

1. Buffer fosfat-1 (0.1 M, pH 8.0)
2. Buffer fosfat-2 (0.1 M, pH 7.0)
3. Reagen Dapar Ellman, DTNB
4. Asetilkolin iodida, 75 mmol/l
5. Asetilkolinesterase (AChE)
6. Mikropipet
7. Pipet kaca
8. Stopwatch
9. Waterbath

10. Spektrofotometer UV/VIS

11. Sampel uji (ekstrak mentah, produk alami murni, atau senyawa sintetis)

Persiapan Reagen

Buffer fosfat-1 (0.1 M) (Untuk enzim dan sampel uji)

(I) Larutkan 15,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 750 ml air

(II) Periksa pH pada 25°C

(III) Sesuaikan hingga pH 8.0 dengan menambahkan larutan NaOH (100 mmol/l)

(IV) Tambahkan air destilasi sampai 1 liter

(V) Simpan larutan buffer-1 pada 4°C

Larutan buffer ini stabil selama tidak terjadi kontaminasi mikroba

Buffer fosfat-2 (0.1 M) (Untuk reagen Ellman, DTNB)

(I) Larutkan 15,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dalam 750 ml air

(II) Periksa pH pada 25°C

(III) Sesuaikan pH 7,0 dengan menambahkan larutan NaOH (100 mmol/l)

(VI) Tambahkan air destilasi sampai 1 liter

(IV) Simpan larutan buffer-2 pada suhu 4°C

Larutan dapat stabil selama tidak terjadi kontaminasi mikroba.

Reagen Dapar Ellman (DTNB, 0.1M/1; NaHCO₃, 17.85 mmol/l)

(I) Larutkan 39,6 mg DTNB dalam 10 ml larutan buffer-2 fosfat.

(II) Tambahkan 15 mg NaHCO₃.

(III) Simpan dalam botol gelap pada suhu 4°C.

Larutan stabil selama 4 minggu jika disimpan dalam botol gelap.

A) Asetilkolin iodida (75 mmol/l) (Substrat)

(I) Larutkan 108,35 mg asetiltiokolin iodida dalam 5 ml. air.

(II) Simpan pada suhu 4°C.

Larutan tidak boleh disimpan lebih dari 7 hari.

Asetilkolinesterase (Enzim)

(I) Larutan enzim dibuat dengan melarutkan enzim dalam dapar fosfat-1 sehingga konsentrasi enzim dalam campuran reaksi adalah sekitar 0,0025 U/ml.

(II) Simpan dalam penangas air es pada suhu 5°C.

Uji larutan sampel

Sampel uji harus dilarutkan dalam pelarut yang tepat (lebih disukai air) dengan konsentrasi yang diinginkan, tetapi untuk senyawa yang tidak larut dalam air, efek pelarut lain pada aktivitas enzim harus diperiksa sebelum percobaan; kontrol harus menerima volume pelarut yang sama.

Langkah-langkah uji penghambatan asetilkolinesterase:

1. Ambil 2,81 ml buffer fosfat-1.
2. Tambahkan 30µl larutan sampel uji.
3. Tambahkan 30 µl larutan stok enzim.
4. Tambahkan 100 µl larutan stok DTNB ke dalamnya.
5. Inkubasi selama 5-10 menit pada 25 °C.
6. Tambahkan 30 µl larutan stok substrat.

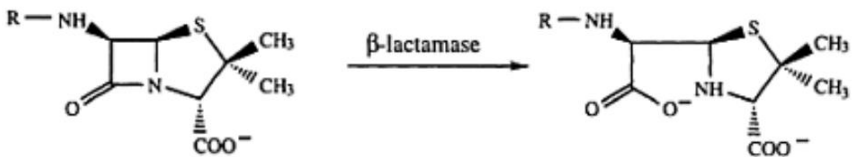
Perhitungan Persentase Inhibisi

Persentase penghambatan aktivitas enzim dapat dihitung sebagai berikut :

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

6.5 Uji Penghambatan Enzim β -Laktamase

Enzim β -laktamase diproduksi oleh bakteri sebagai bagian dari mekanisme resistensi terhadap antibiotik yang mengandung β -laktam. Sejumlah besar β -laktamase (EC 3.5.2.6) telah diidentifikasi. β -Laktamase (sering disebut penicillinase, sefalosporinase atau karbapenemase, tergantung pada spesifisitas substrat) adalah plasmid atau secara kromosomal enzim bakteri yang dikodekan yang menonaktifkan antibiotik β -laktam. Enzim secara efisien menghidrolisis ikatan amida dari bagian β -laktam, sehingga menghasilkan produk tanpa aktivitas antibiotik.



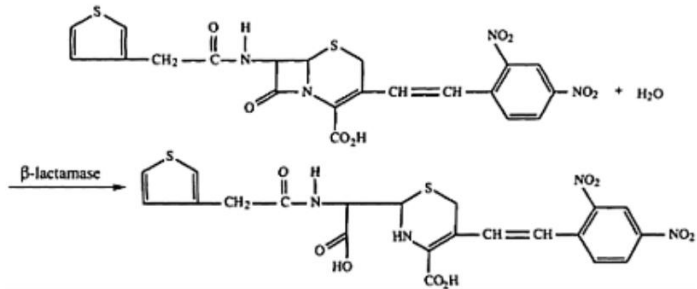
Kepentingan klinis inhibitor β -laktamase tercermin dari fakta bahwa sebagian besar agen antimikroba yang umum digunakan adalah antibiotik yang mengandung β -laktam seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem, dan monobaktam. Karena profil keamanan dan kemanjuran klinis yang terbukti, antibiotik ini banyak digunakan untuk pengobatan penyakit-penyakit menular. Oleh karena itu, pencarian inhibitor β -laktamase baru memiliki potensi klinis dan komersial yang luar biasa.

Uji Spektrofotometri

Pengukuran jumlah antibiotik seperti nitrocefin yang dihidrolisis per satuan waktu dapat diamati menggunakan spektrofotometri dengan peningkatan absorbansi pada 495 nm, karena hidrolisis sefalosporin yang sangat terkonjugasi. Meskipun penisilin atau sefalosporin lain dapat digunakan sebagai substrat dalam pengujian ini, nitrocefin memiliki spektrum kerentanan dan sensitivitas lebih luas di antara antibiotik yang mengandung β -laktam yang tersedia secara komersial (untuk substrat lain, kisaran panjang gelombang UV tergantung pada sifat substrat).

Bahan:

1. Buffer fosfat (100 mmol/l, pH 7.0)
2. Nitrocefin
3. Enzim β -laktamase
4. DMSO
5. kertas pH
6. Air destilasi
7. Labu volumetrik
8. Botol reagen kaca gelap
9. Mikropipet
10. Stopwatch
11. Spektrofotometer UV/VIS
12. Sampel uji (ekstrak mentah, senyawa alam murni, atau senyawa sintetik)



Preparasi Reagen

Dapar fosfat (100 mmol/l, pH 7.0)

(I) Melarutkan 13,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 500ml air destilasi.

(II) Larutkan 6,85 g KH_2PO_4 dalam 500ml air destilasi.

(III) Campurkan 80 ml larutan dinatrium hidrogen fosfat dengan 45 ml larutan dihidrogen kalium fosfat.

(IV) Periksa pH dan sesuaikan dengan pH 7,0 jika perlu dengan penambahan larutan fosfat yang sesuai. Meskipun pH optimum 7,0 telah dilaporkan untuk banyak enzim, pengujian dapat dilakukan antara pH 6,0 dan 8,0 dalam buffer fosfat (100-200 mmol/l).

(V) Simpan larutan antara suhu 0–4°C. Larutan ini harus dibuat paling tidak seminggu sebelum pengujian (kondisi baik)

Substrat Nitrocefin (0.19 mmol/l)

(I) Masukkan 5.0 ± 0.2 mg nitrocefin ke dalam labu takar 50 ml. *

β -laktamase dari *Staphylococcus aureus* umumnya menempel pada permukaan kaca. Oleh karena itu, harus menggunakan kuvet sekali pakai untuk pengujian enzim atau kuvet kaca harus dibilas dengan benar dengan etanol sebelum menambahkan sampel baru untuk mencegah terbawanya enzim aktif.

(II) Larutkan dalam 0,5 ml DMSO (dimetil sulfoksida).

(III) Tambahkan dapar fosfat (100 mmol/l, pH 7.0) untuk menghasilkan volume akhir 50 ml.

(IV) Simpan dalam botol gelap pada suhu 4°C (jika terlindung dari cahaya, larutan ini mempertahankan stabilitas lebih dari 90% setelah penyimpanan selama 2 minggu

Enzim β -Laktamase

Siapkan larutan enzim sehingga konsentrasi enzim menjadi 550 m unit/ml.

Uji Larutan Sampel

Larutan sampel uji harus disiapkan dalam air dalam konsentrasi yang diinginkan. Jika terdapat senyawa yang tidak larut, pengaruh pelarut pada aktivitas enzim harus diperiksa sebelum percobaan dan kontrol harus menerima volume pelarut yang sama.

Langkah-langkah uji penghambatan β -laktamase:

- Preinkubasi sampel uji dengan enzim selama 5-10 menit.
- Mulai reaksi dengan menambahkan 1,0 ml larutan nitrocefin.
- Aduk rata menggunakan sendok pengaduk plastik.
- Baca absorbansi pada 495 nm, dan mulai stopwatch. Ulangi pembacaan tepat setiap 15 detik. atau monitor pada *recorder*.

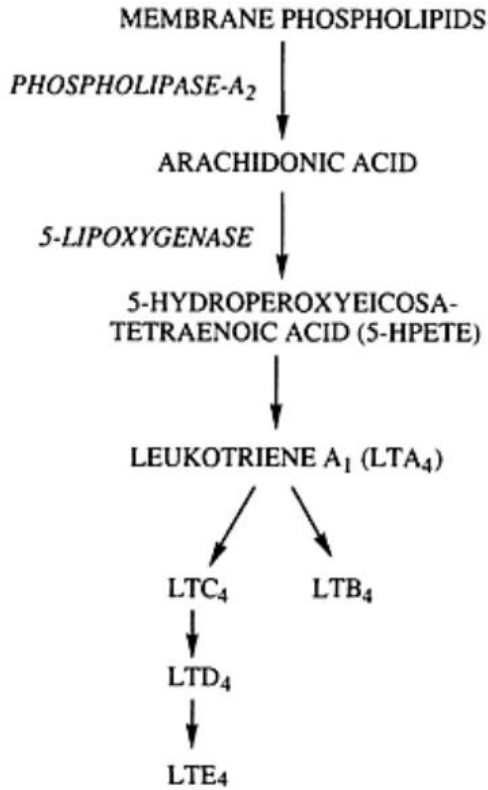
Perhitungan Persentase Inhibisi

Persentase penghambatan aktivitas enzim dapat dihitung sebagai berikut :

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$

6.6 Uji Penghambatan 5-Lipoxygenase

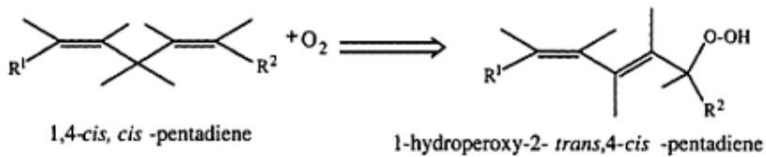
Enzim mamalia 5-lipoxygenase memberikan peran penting dalam konversi asam arakidonat ke sejumlah turunan lipoxygenase, termasuk 5-HPETE, LTA_4 , LTB_4 , dan peptidoleukotrien LTC_4 , LTD_4 , dan LTE_4 (Skema-3). Absorbansi (kontrol) Leukotrien telah diidentifikasi sebagai komponen SRS-A (zat anafilaksis yang bereaksi lambat). Karena mediator ini telah terbukti memiliki sifat kemotaktik, bronkokonstriktor, dan kebocoran vaskular yang poten, mereka juga terlibat sebagai mediator penting dari berbagai penyakit alergi termasuk asma. Berbagai produk lipoksigenase (LTB_4) juga menunjukkan sifat proinflamasi baik *in vitro* maupun *in vivo*. Dengan demikian penghambatan 5-lipoxygenase saat ini menjadi subjek penelitian intensif yang ditargetkan untuk menemukan agen anti-alergi dan anti-inflamasi baru.



Scheme-3:

Uji Spektrofotometri

Lipoksigenase mengkatalisis reaksi asam lemak polienoat, yang mengandung setidaknya 1,4- cis, cis-sistem pentadiena, dengan dioksigen membentuk 1-hidroperoksi-2-trans, 4-cis turunan.



Aktivitas penghambatan 5-lipoksigenase diukur dengan peningkatan absorbansi pada 234 nm setelah inkubasi enzim dengan substrat.

Bahan:

1. Buffer fosfat (0.1 M, pH 7.4, mengandung 4% sodium cholate of analytical grade).
2. Campuran substrat (asam linoleat atau asam arakidonat).
3. 5-Lipoksigenase
4. Mikropipet
5. Pipet kaca
6. Stopwatch
7. Spektrofotometer UV/VIS
8. Sampel Uji (ekstrak mentah, produk alam murni atau senyawa sintetik).

1) Persiapan Reagen

Buffer fosfat (0.1 M, pH 7.4)

- (I) Larutkan 15,6 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ dalam 750 ml air.
- (II) Periksa pH pada 25°C.

(III) Sesuaikan pH 7.4 dengan menambahkan larutan NaOH (100 mmol/l).

(IV) Tambahkan 4% natrium kolat.

(V) Sesuaikan pH lebih lanjut jika perlu.

(VI) Tambahkan air destilasi sampai 1 liter

Disimpan pada suhu 4°C, larutan ini stabil selama tidak terjadi kontaminasi mikroba.

Campuran Substrat

(I) Campurkan 0,2 ml asam linoleat murni (atau asam arakidonat) dengan 1 ml metanol yang baru disuling.

(II) Simpan larutan stok ini di bawah atmosfer nitrogen pada -20°C.

(III) Campurkan 20 ml larutan stok dengan 20 ml 0,54 M KOH atau 0,54 M NH₄OH.

(IV) Tambahkan campuran yang baru dibuat ini ke dalam 2 ml buffer fosfat 0,1 M dingin.

Sampel Uji

(I) Larutkan sampel uji dalam metanol, etanol, 2-metoksi etanol (metil glikol) atau DMSO sebagai larutan 0,1 M.

(II) Tambahkan larutan sampel uji dalam pengenceran yang tepat dalam pelarut yang sama dalam volume sedemikian rupa sehingga konsentrasi akhir pelarut tidak melebihi 2% dari volume akhir.

(III) Tambahkan jumlah pelarut yang sama ke sampel kontrol yang ditangani secara identik.

Larutan Enzim

(I) Larutan enzim lipoksigenase dibuat sehingga konsentrasi enzim dalam campuran reaksi diatur untuk memberikan laju absorbansi 0,05 per menit.

-Uji penghambatan lipoxygenase melibatkan langkah-langkah berikut:

1. Masukkan 0,95 ml dapar fosfat 0.1 M, pH 7.4 ke dalam kuarsa kuvet yang telah didinginkan.
2. Tambahkan larutan enzim
3. Tambahkan sekitar 50 µl larutan senyawa uji.
4. Inkubasi selama 5-10 menit pada 20 °C.
5. Mulai reaksi dengan menambahkan 50 µl campuran substrat.
6. Aduk perlahan dan catat absorbansinya pada 234 nm selama 2-3 menit.

Perhitungan Persentase Inhibisi

Persentase penghambatan aktivitas enzim dapat dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorbansi (kontrol)} - \text{Absorbansi (uji)}}{\text{Absorbansi (kontrol)}} \times 100$$



**DAFTAR
PUSTAKA**

- Agarwal, P.K., 2019. A Biophysical Perspective on Enzyme Catalysis. *Biochemistry* 58, 438–449. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b0100>
- Agudo-Canalejo, J., Illien, P., Golestanian, R., 2018. Phoresis and Enhanced Diffusion Compete in Enzyme Chemotaxis. *Nano Lett.* 18, 2711–2717. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00717>
- Alderson, R.G., De Ferrari, L., Mavridis, L., McDonagh, J.L., Mitchell, J.B.O., Nath, N., 2012. Enzyme informatics. *Curr. Top. Med. Chem.* 12, 1911–1923. <https://doi.org/10.2174/156802612804547353>
- Anderson, V.E., 2015. Multiple alternative substrate kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 1729–1736. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.05.016>
- Andrén-Sandberg, A., 1989. Theory and practice in the individualization of oral pancreatic enzyme administration for chronic pancreatitis. *Int. J. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol.* 5 Suppl, 51–62.
- Arcus, V.L., Mulholland, A.J., 2020. Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. *Annu. Rev. Biophys.* 49, 163–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-121219-081520>
- Arcus, V.L., Prentice, E.J., Hobbs, J.K., Mulholland, A.J., Van der Kamp, M.W., Pudney, C.R., Parker, E.J., Schipper, L.A., 2016. On the Temperature Dependence of Enzyme-Catalyzed Rates. *Biochemistry* 55, 1681–1688. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01094>
- Bauer, C., Osman, A.M., Cercignani, G., Gialluca, N., Paolini, M., 2001. A unified theory of enzyme kinetics based upon the systematic analysis of the variations of $k(\text{cat})$, $K(M)$, and $k(\text{cat})/K(M)$ and the relevant $\Delta G(0 \text{ not equal})$ values—possible implications in chemotherapy and biotechnology. *Biochem. Pharmacol.* 61, 1049–1055. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00579-2](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00579-2)
- Bollella, P., Katz, E., 2020. Enzyme-Based Biosensors: Tackling Electron Transfer Issues. *Sensors* 20, E3517. <https://doi.org/10.3390/s20123517>

- Brooks, S.P., Suelter, C.H., 1989. Practical aspects of coupling enzyme theory. *Anal. Biochem.* 176, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90263-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90263-7)
- Bruice, T.C., Kahn, K., 2000. Computational enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 540–544. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(00)00129-0)
- Concu, R., D S Cordeiro, M.N., Munteanu, C.R., González-Díaz, H., 2019. PTML Model of Enzyme Subclasses for Mining the Proteome of Biofuel Producing Microorganisms. *J. Proteome Res.* 18, 2735–2746. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.8b00949>
- Coulson, R.A., 1993. The flow theory of enzyme kinetics: role of solid geometry in the control of reaction velocity in live animals. *Int. J. Biochem.* 25, 1445–1474. [https://doi.org/10.1016/0020-711x\(93\)90692-8](https://doi.org/10.1016/0020-711x(93)90692-8)
- Culka, M., Gisdon, F.J., Ullmann, G.M., 2017. Computational Biochemistry-Enzyme Mechanisms Explored. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 109, 77–112. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2017.04.004>
- Dixit, M., Das, S., Mhashal, A.R., Eitan, R., Major, D.T., 2016. Practical Aspects of Multiscale Classical and Quantum Simulations of Enzyme Reactions. *Methods Enzymol.* 577, 251–286. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.046>
- Dubey, K.D., Singh, W., 2021. Simulations reveal the key role of Arg15 in the promiscuous activity in the HisA enzyme. *Org. Biomol. Chem.* 19, 10652–10661. <https://doi.org/10.1039/d1ob02029c>
- Dunker, A.M., Lusk, J.E., Gibbs, J.H., 1980. Enzyme reaction rates and the stochastic theory of kinetics. *Biophys. Chem.* 11, 9–16. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(80\)85002-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(80)85002-2)
- Easterby, J.S., 1981. A generalized theory of the transition time for sequential enzyme reactions. *Biochem. J.* 199, 155–161. <https://doi.org/10.1042/bj1990155>
- Elsässer, B., Goettig, P., 2021. Mechanisms of Proteolytic Enzymes and Their Inhibition in QM/MM Studies. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 3232. <https://doi.org/10.3390/ijms22063232>
- Estácio, S.G., 2012. In silico strategies toward enzyme function

- and dynamics. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 87, 249–292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398312-1.00009-3>
- Fisher, H.F., 2013. The application of transient-state kinetic isotope effects to the resolution of mechanisms of enzyme-catalyzed reactions. *Mol. Basel Switz.* 18, 8230–8242. <https://doi.org/10.3390/molecules18078230>
- Gao, J., Truhlar, D.G., 2002. Quantum mechanical methods for enzyme kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 53, 467–505. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.53.091301.150114>
- Glowacki, D.R., Harvey, J.N., Mulholland, A.J., 2012a. Protein dynamics and enzyme catalysis: the ghost in the machine? *Biochem. Soc. Trans.* 40, 515–521. <https://doi.org/10.1042/BST20120047>
- Glowacki, D.R., Harvey, J.N., Mulholland, A.J., 2012b. Taking Ockham’s razor to enzyme dynamics and catalysis. *Nat. Chem.* 4, 169–176. <https://doi.org/10.1038/nchem.1244>
- Hatzimanikatis, V., Li, C., Ionita, J.A., Broadbelt, L.J., 2004. Metabolic networks: enzyme function and metabolite structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.04.004>
- Hennefarth, M.R., Alexandrova, A.N., 2022. Advances in optimizing enzyme electrostatic preorganization. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 72, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.006>
- Hocker, C.G., 1994. Applying bifurcation theory to enzyme kinetics. *Methods Enzymol.* 240, 781–816. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)40071-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)40071-7)
- Johannissen, L.O., Iorgu, A.I., Scrutton, N.S., Hay, S., 2019. What are the signatures of tunnelling in enzyme-catalysed reactions? *Faraday Discuss.* 221, 367–378. <https://doi.org/10.1039/c9fd00044e>
- Kari, J., Schiano-di-Cola, C., Hansen, S.F., Badino, S.F., Sørensen, T.H., Cavaleiro, A.M., Borch, K., Westh, P., 2020. A steady-state approach for inhibition of heterogeneous enzyme reactions. *Biochem. J.* 477, 1971–1982. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200083>

- Kauffmann, J.M., Guilbault, G.G., 1992. Enzyme electrode biosensors: theory and applications. *Methods Biochem. Anal.* 36, 63–113. <https://doi.org/10.1002/9780470110577.ch3>
- Kholodenko, B.N., Westerhoff, H.V., 1994. Control theory of one enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1208, 294–305. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(94\)90116-3](https://doi.org/10.1016/0167-4838(94)90116-3)
- Klinman, J.P., 2006. The role of tunneling in enzyme catalysis of C-H activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1757, 981–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2005.12.004>
- Linenberger, K.J., Bretz, S.L., 2015. Biochemistry students' ideas about how an enzyme interacts with a substrate. *Biochem. Mol. Biol. Educ. Bimon. Publ. Int. Union Biochem. Mol. Biol.* 43, 213–222. <https://doi.org/10.1002/bmb.20868>
- Lonsdale, R., Harvey, J.N., Mulholland, A.J., 2012. A practical guide to modelling enzyme-catalysed reactions. *Chem. Soc. Rev.* 41, 3025–3038. <https://doi.org/10.1039/c2cs15297e>
- Lorsch, J.R., 2014. Practical steady-state enzyme kinetics. *Methods Enzymol.* 536, 3–15. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420070-8.00001-5>
- Masgrau, L., Truhlar, D.G., 2015. The importance of ensemble averaging in enzyme kinetics. *Acc. Chem. Res.* 48, 431–438. <https://doi.org/10.1021/ar500319e>
- McGeagh, J.D., Ranaghan, K.E., Mulholland, A.J., 2011. Protein dynamics and enzyme catalysis: insights from simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1814, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.12.002>
- McLarin, M.-A., Leung, I.K.H., 2020. Substrate specificity of polyphenol oxidase. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 55, 274–308. <https://doi.org/10.1080/10409238.2020.1768209>
- Mohajerani, F., Zhao, X., Somasundar, A., Velegol, D., Sen, A., 2018. A Theory of Enzyme Chemotaxis: From Experiments to Modeling. *Biochemistry* 57, 6256–6263. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00801>
- Moreira, C., Calixto, A.R., Richard, J.P., Kamerlin, S.C.L., 2019. The role of ligand-gated conformational changes in enzyme catalysis. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 1449–1460.

- <https://doi.org/10.1042/BST20190298>
- Mulholland, A.J., 2005. Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis. *Drug Discov. Today* 10, 1393–1402. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03611-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03611-1)
- Munro, A.W., Scrutton, N.S., 2009. Enzyme mechanisms: fast reaction and computational approaches. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 333–335. <https://doi.org/10.1042/BST0370333>
- Papaleo, E., Tiberti, M., Invernizzi, G., Pasi, M., Ranzani, V., 2011. Molecular determinants of enzyme cold adaptation: comparative structural and computational studies of cold- and warm-adapted enzymes. *Curr. Protein Pept. Sci.* 12, 657–683. <https://doi.org/10.2174/1389203711109070657>
- Patiño, T., Arqué, X., Mestre, R., Palacios, L., Sánchez, S., 2018. Fundamental Aspects of Enzyme-Powered Micro- and Nanoswimmers. *Acc. Chem. Res.* 51, 2662–2671. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00288>
- Pinto, M.F., Estevinho, B.N., Crespo, R., Rocha, F.A., Damas, A.M., Martins, P.M., 2015. Enzyme kinetics: the whole picture reveals hidden meanings. *FEBS J.* 282, 2309–2316. <https://doi.org/10.1111/febs.13275>
- Prejanò, M., Romeo, I., Sgrizzi, L., Russo, N., Marino, T., 2019. Why hydroxy-proline improves the catalytic power of the peptidoglycan N-deacetylase enzyme: insight from theory. *Phys. Chem. Chem. Phys.* PCCP 21, 23338–23345. <https://doi.org/10.1039/c9cp03804c>
- Rademaker, B., Raber, J., 1989. Enzyme-replacement therapy: problems and prospects. *Pharm. Weekbl. Sci.* 11, 137–145. <https://doi.org/10.1007/BF01959460>
- Ricard, J., Noat, G., 1986. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 1. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system. *Eur. J. Biochem.* 155, 183–190. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09475.x>
- Robin, T., Reuveni, S., Urbakh, M., 2018. Single-molecule theory of enzymatic inhibition. *Nat. Commun.* 9, 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02995-6>
- Roda, S., Santiago, G., Guallar, V., 2020. Mapping enzyme-

- substrate interactions: its potential to study the mechanism of enzymes. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 122, 1–31. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.06.001>
- S, M., M, R., J, A., V, M., E, S., I, T., J, B., 2004. Theoretical insights in enzyme catalysis. *Chem. Soc. Rev.* 33. <https://doi.org/10.1039/b301875j>
- Schramm, V.L., 2018. Enzymatic Transition States and Drug Design. *Chem. Rev.* 118, 11194–11258. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00369>
- Schulenburg, C., Miller, B.G., 2014. Enzyme recruitment and its role in metabolic expansion. *Biochemistry* 53, 836–845. <https://doi.org/10.1021/bi401667f>
- Silverstein, T.P., 2021. Enzyme free energy profiles: Can substrate binding be nonspontaneous? Can ground state interactions enhance catalysis? *Biophys. Chem.* 274, 106606. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106606>
- Soo, V.W., Kulikowski, C.A., Garfinkel, D., Garfinkel, L., 1988. Theory formation in postulating enzyme kinetic mechanisms: reasoning with constraints. *Comput. Biomed. Res. Int. J.* 21, 381–403. [https://doi.org/10.1016/0010-4809\(88\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0010-4809(88)90052-3)
- Sorribas, A., Savageau, M.A., 1989. A comparison of variant theories of intact biochemical systems. I. Enzyme-enzyme interactions and biochemical systems theory. *Math. Biosci.* 94, 161–193. [https://doi.org/10.1016/0025-5564\(89\)90064-3](https://doi.org/10.1016/0025-5564(89)90064-3)
- Svetlichny, G., 2017. The enzyme-substrate complex as a cat state: A toy quantum analog. *Biosystems* 162, 157–167. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.10.008>
- Truhlar, D.G., 2015. Transition state theory for enzyme kinetics. *Arch. Biochem. Biophys.* 582, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.05.004>
- Vardi-Kilshtain, A., Nitoker, N., Major, D.T., 2015. Nuclear quantum effects and kinetic isotope effects in enzyme reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 582, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.001>
- Verhaert, R.M., Hilhorst, R., Vermuë, M., Schaafsma, T.J.,

Veeger, C., 1990. Description of enzyme kinetics in reversed micelles. 1. Theory. *Eur. J. Biochem.* 187, 59–72. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15277.x>

Vivoli, M., Pang, J., Harmer, N.J., 2017. A half-site multimeric enzyme achieves its cooperativity without conformational changes. *Sci. Rep.* 7, 16529. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16421-2>

Zhao, Q., 2017. On the indirect relationship between protein dynamics and enzyme activity. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 125, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.02.001>

Zhao, Q., 2011. Dynamic model for enzyme action. *Protein Pept. Lett.* 18, 92–99. <https://doi.org/10.2174/092986611794328618>



INDEX

bioassay, 2
DMSO, 7, 15, 19, 33, 49,
133, 152, 157, 158, 174,
176, 181
Farnesyltransferase, 40, 50
inhibitor, 34
Nonrekombinan, 104
Plot Lineweaver-Burke, 37
plot Scatchard, 125
protein rekombinan, 11
uji enzim, 18
Uji Kalsium Intraseluler, 84
uji proliferasi, 85, 86, 87, 88,
89, 91
uji reseptor fungsional, 53,
85, 92, 106



GLOSARIUM

Ekstrak Zat yang dihasilkan dari ekstraksi bahan mentah secara kimiawi. Senyawa kimia yang diekstrak meliputi senyawa aromatik, minyak atsiri, ester, dan sebagainya yang kemudian menjadi bahan baku proses industri atau digunakan secara langsung oleh masyarakat.

In vitro Uji kultur suatu sel, jaringan, atau bagian organ tertentu di dalam laboratorium.

Enzim Enzim adalah biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia organik.

Reseptor Reseptor adalah molekul protein yang menerima sinyal kimia dari luar sel.

Radioligan Zat biokimia radioaktif yang digunakan untuk diagnosis atau untuk penelitian berorientasi pada sistem reseptor tubuh.

Makrofag jenis sel darah putih dari sistem imun yang menelan dan mencerna patogen, seperti sel kanker, mikroba, puing-puing seluler, dan zat asing.

Interferon Hormon berbentuk sitokin berupa protein berjenis glikoprotein yang disekresi oleh sel vertebrata karena akibat rangsangan

	biologis.
Inhibitor	Zat yang menghambat atau menurunkan laju reaksi kimia. Sifat inhibitor berlawanan dengan katalis, yang mempercepat laju reaksi.
Kromatografi	Suatu teknik pemisahan <u>molekul</u> berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan
High throughput	Uji seleksi berkelanjutan
Proliferasi	Fase sel saat mengalami pengulangan siklus sel tanpa hambatan.
Mitogenesis	proses induksi mitosis dalam sel, baik hiperplasia dan regenerasi berhubungan dengan mitogenesis.
Antibodi monoklonal	antibodi monospesifik yang dapat mengikat satu epitop.
Melanosom	Organel yang menyimpan melanosit.
Neutrofil	Bagian sel darah putih dari kelompok granulosit
Fluoresensi	Fluoresensi adalah terpancarnya sinar oleh suatu zat yang telah menyerap sinar atau radiasi elektromagnet.

Hyaluronidase Keluarga enzim yang mengkatalisis degradasi asam hialuronat.