

PENGESANAN ENZIM PROTEINASE DALAM
Acanthamoeba spp.

NOOR ERMA SURIA BT AB RAHMAN

FAKULTI SAINS DAN TEKNOLOGI
KOLEJ UNIVERSITI SAINS DAN TEKNOLOGI MALAYSIA
UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA
2002

LP 16 FST 6 2002



1100024599

Pengesanan enzim proteinase dalam Acanthamoeba spp. / Noor Erma Suria Ab Rahman.



LP
41
FST
9
2002

PERPUSTAKAAN
KOLEJ UNIVERSITI SAINS & TEKNOLOGI MALAYSIA
21030 KUALA TERENGGANU

1100024599	

1100024599

PERPUSTAKAAN
KOLEJ UNIVERSITI SAINS & TEKNOLOGI MALAYSIA
(KUSTEM) dn 1166

Pengarang NOOR ERMA		No. Panggilan LP 41	
Judul Pengesanan enzim proteinase dlm Acanthamoeba spp FST			
Tarikh	Waktu Pemulangan	Nombor Ahli	Tanda tangan
02/12/05		UK 8552	2002

21/2/10

PENGESANAN ENZIM PROTEINASE DALAM *Acanthamoeba* spp

Oleh

Noor Erma Suria Bt Ab Rahman

Laporan ini dikemukakan sebagai keperluan untuk mendapatkan Ijazah
Sains Pendidikan Biologi

PUSAT PEMBELAJARAN DIGITAL SUKMAH PER ZAHIRAH

Jabatan Sains Biologi

Fakulti Sains dan Teknologi

Kolej Universiti Sains dan Teknologi Malaysia

Universiti Putra Malaysia

2002

1100024599

Laporan kajian ini hendaklah dirujuk sebagai :

Erma Suria A.R. 2002. Pengesanan Enzim Proteinase dalam *Acanthamoeba* spp. Laporan Projek, Bacelor Sains Pendidikan (Kepujian) Biologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Kolej Universiti Sains dan Teknologi Malaysia, (Universiti Putra Malaysia).59p.

Tidak dibenarkan mengeluarkan ulang mana-mana bahagian dan kandungan laporan ini dalam apa jua bentuk dan dengan apa cara pun sama ada secara elektronik, fotokopi, mekanik, rakaman atau cara lain sebelum mendapat izin bertulis daripada penulis atau Penyelia Utama penulis tersebut.

UNIVERSITI PUTRA MALAYSIA TERENGGANU

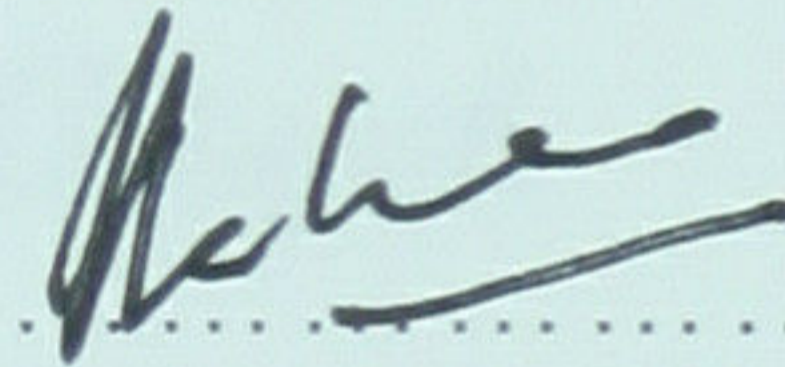
PENGAKUAN DAN PENGESAHAN

Adalah ini diakui dan disahkan laporan projek penyelidikan tahun akhir bertajuk **Pengesanan Enzim Proteinase dalam *Acanthamoeba* spp** oleh **Noor Erma Suria Binti Ab. Rahman** No. matrik **UK 3327** telah dibaca dan semua pembetulan yang disarankan oleh pemeriksa-pemeriksa telah dibuat. Laporan ini dikemukakan kepada Jabatan Sains Biologi sebagai kelayakan untuk memenuhi keperluan ijazah **Bachelor Sains dengan Pendidikan (K)-Biologi** di Fakulti Sains dan Teknologi, Kolej Universiti Sains Teknologi Malaysia.

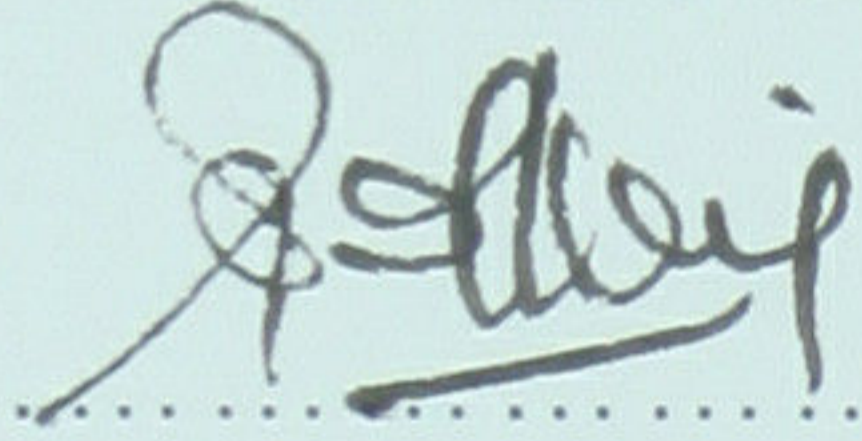
Tarikh: **10 FEBRUARI 2002**

Tarikh: **7 FEBRUARI 2002**

Disahkan:



Tandatangan Penyelia 1
MAKISAH BT. MAT AMIN (PhD)
Nama / Cop Rasmi: **Profesor Madya**
Jabatan Sains Biologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Kolej Universiti Sains dan Teknologi Malaysia
Mengabang Telipot
21030 Kuala Terengganu.



Tandatangan Ketua Jabatan

Nama / Cop Rasmi:

PROF. MADYA DR. SAYED MOHD ZAIN S. HASAN
Ketua
Jabatan Sains Biologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Kolej Universiti Terengganu
Mengabang Telipot
21030 Kuala Terengganu

*Sekalung kasih buat,
Ayahanda yang dikasahi, Ab. Rahman bin Deris,
Bonda tercinta, Maimunah Binti Awang,
Adik-adik tersayang,
Noor Eliza, Mohd. Isyalmi, Mohd. Ridhuan,
Mohd. Adib Ikhwan, Noor Ernie Atiqah*

PENGHARGAAN

Syukur Alhamdulillah, setelah melalui berbagai-bagai mehnah, akhirnya Laporan Projek Tahun Akhir ini dapat jua disiapkan. Laporan ini adalah sebahagian daripada keperluan untuk bergraduat. Penghargaan yang tidak terhingga ditujukan khas kepada Prof. Madya Dr. Nakisah Binti Mat Amin selaku Penyelia yang banyak memberi panduan dan tunjuk ajar dengan penuh kesabaran serta dedikasi sehingga saya dapat menyelesaikan kajian yang dilakukan. Pengalaman yang dilalui amat berharga dan akan dijadikan panduan di hari muka.

Saya juga ingin merakamkan penghargaan kepada Pembantu Penyelidik, Cik Fatimah Hashim, Kak Anis dan Kak Aya yang banyak menolong saya sepanjang menjalankan kajian di makmal. Tidak lupa juga buat Mi dan Abah serta adik-adik yang dikasihi yang tak jemu-jemu memberi semangat dan dorongan yang padu buat Kak Long.

Penghargaan istimewa buat rakan-rakan seperjuangan, team BIO-T khususnya Norwaniza dan Fatihah yang sentiasa mewarnai dunia persahabatan. Buat Kak E-ja, Kak Shiroh, E-na, Ana dan Raza terima kasih di atas pengorbanan anda selama ini. Sesungguhnya kenangan bersama kalian amat berharga dan akan sentiasa tersemat di hati. Tanpa kalian hidup ini tidak akan merasa nikmat persahabatan yang unggul. Segala yang baik itu datang dari Allah dan segala yang buruk itu datang dari saya sendiri, Wallahualam.....

ABSTRAK

Kehadiran enzim proteinase dalam ameba memainkan peranan penting dalam patogenesis ameba tersebut. Dengan itu, kajian ini adalah bertujuan untuk mengesan kehadiran proteinase dan jenisnya dalam sel lisat ameba, serta mencirikan enzim tersebut dalam tiga spesies ameba iaitu *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba sp* dan *Acanthamoeba polyphaga* berdasarkan berat molekul (M_r), aktiviti enzim pada pH yang berbeza, sama ada dengan kehadiran DTT atau tanpa kehadiran DTT serta kesan perencat enzim ke atas aktiviti enzim tersebut. Kajian pengesanan enzim proteinase dalam *Acanthamoeba spp* ini dilakukan dengan menggunakan kaedah gelatin-Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Buffer System (Gelatin-SDS-PAGE). Di atas gel gelatin-SDS-PAGE, *Acanthamoeba castellanii* dikesan mempunyai empat jalur proteinase yang mempunyai berat molekul antara 14.3 kDa – 29 kDa. Jalur enzim pertama dikesan pada semua pH kecuali pH 6.0 dan 6.5 dengan kehadiran DTT. Jalur enzim kedua ($M_r \sim 18.4$ kDa) pula adalah aktif dalam semua pH dan aktivitiya semakin meningkat dengan kehadiran DTT. Manakala jalur enzim ketiga (M_r antara 14.3 dan 18.4 kDa) dan keempat pula ($M_r < 14.3$ kDa), aktif pada pH 7.0, 7.5 dan 8.0 tanpa kehadiran DTT. Keempat-empat jalur enzim proteinase boleh dikesan pada pH 7.0, 7.5 dan 8.0 dan ini adalah pH optimum bagi aktiviti enzim tersebut. *Acanthamoeba sp* pula mempunyai empat jalur enzim proteinase yang berat molekulnya masing-masing $M_r \sim 68$ kDa (jalur pertama), $M_r > 43$ kDa (jalur kedua), $M_r \sim 43$ kDa (jalur ketiga) dan $M_r < 43$ kDa (jalur keempat). Jalur enzim pertama adalah aktif dalam semua pH dan kehadiran DTT meningkatkan aktivitiya dalam menghidrolisiskan gelatin. Jalur enzim kedua pula

adalah aktif dalam pH 7.0 dan 8.0 sahaja tanpa DTT. Jalur enzim ketiga aktif pada pH 5.5 – 8.0 tanpa kehadiran DTT. Sementara dengan kehadiran DTT, jalur enzim ini hanya aktif dalam pH 7.0, 7.5 dan 8.0. Jalur enzim keempat pula dikesan dalam pH 7.0, 7.5 dan 8.0 dan bergantung kepada DTT. Tiga jalur proteinase iaitu jalur pertama ($M_r \sim 43$ kDa), jalur kedua ($M_r > 29$ kDa) dan jalur ketiga ($M_r \sim 29$ kDa) dikesan di dalam *Acanthamoeba polyphaga*. Jalur enzim pertama dikesan pada semua pH dan aktiviti diaktifkan dengan kehadiran DTT. Jalur enzim kedua pula dikesan pada pH 7.0, 7.5 dan 8.0 dan tidak bergantung kepada DTT. DTT hanya mengaktifkan jalur enzim ini pada pH 5.5 sahaja. Jalur terakhir hanya aktif pada pH 7.0, 7.5 dan 8.0 dengan kehadiran DTT. Berdasarkan aktiviti enzim terhadap perencat, jalur enzim ketiga (M_r 14.3 kDa – 18.4 kDa) dikesan dalam *Acanthamoeba castellanii* direncat oleh PMSF dan Antipain mencadangkan enzim tersebut jenis serine-sistein proteinase; aktif dalam pH tinggi (pH 7.0 – 8.0) dan tidak bergantung kepada DTT. Jalur enzim ketiga ($M_r > 43$ kDa) dikesan dalam *Acanthamoeba sp* direncat oleh perencat Antipain dan E-64, berkemungkinan ia adalah daripada kumpulan sistein proteinase; aktiviti jalur ini adalah tinggi pada pH 7.5 dan 8.0, tidak bergantung kepada DTT. Jalur enzim pertama, kedua dan ketiga yang dikesan dalam *Acanthamoeba polyphaga* direncat oleh perencat PMSF dan Antipain menunjukkan ia dari kumpulan serine proteinase. Perbezaan bilangan dan jenis proteinase yang terhasil dalam ketiga-tiga spesies adalah disebabkan ketiga-tiga ameba tadi dari spesies yang berbeza dan juga memungkinkan cara pemakanan serta fisiologi ameba yang dikaji berbeza.

ABSTRACT

The presence of proteinases in Amoebae play an important role in amoeba pathogenesis. Therefore, this study was conducted to detect the proteinases enzymes in cell lysates of amoeba and characterize them based on their molecular weight (M_r), activities of different pHs either in the presence of DTT or not, and the effect of various inhibitors on their activities on the gel. Three species of *Acanthamoeba* were used in this study; *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba sp.* The detection of proteinases in this study was done using gelatine-Sodium Dodecyl Sulphite Polyacrylamide gel Electrophoresis. On the gelatine-SDS-PAGE gels, four bands of proteinase were detected in *Acanthamoeba castellanii* lysates. First (top) band was detected which its molecular weight is $M_r >18.4$ kDa, was active in pHs 5.5, 7.0, 7.5, 8.0 without DTT and pH 5.5, 7.0, 7.5, 8.0 with DTT except pH 6.0 and pH 6.5 its activity was activated with the presence of DTT. The second band ($M_r \sim 18.4$ kDa) was active in all pHs and with the presence of DTT which enhances its activity. Both the third band (M_r between 14.3 – 18.4 kDa), and the fourth band ($M_r <14.3$ kDa) were active at the same pH (pH 7.0, 7.5 and 8.0), without DTT. All of the four bands were detected at the pH 7.0, 7.5 and 8.0, without DTT, and these pHs were the optimal pH for the maximum activities of proteinases. *Acanthamoeba sp* lysates has four band of proteinases with their M_r are first band ($M_r \sim 68$ kDa), second band (M_r between 43 kDa-68 kDa), third band ($M_r \sim 43$ kDa) and fourth band ($M_r <43$ kDa). The first band was active in all pHs, and with the presence of DTT seems to enhance the activities of the band. The second band was active in pH 7.0 and 8.0 only, without DTT. The third band was observed in pH 5.5 – 8.0 and not DTT dependent. In the presence of DTT, this enzyme

was active in pH 7.0, 7.5 and 8.0 only. The fourth band was detected in pH 7.0, 7.5 and 8.0, and its activity was DTT-dependent. Three proteinase enzymes were detected in the lysate of *Acanthamoeba polyphaga*. The first band ($M_r \sim 43$ kDa) was active in all pHs and its activity was enhanced by the presence of DTT. The second band were observed in pH 7.0, 7.5 and 8.0 and was not DTT-dependent. DTT seems to enhance the activity of the enzymes at pH 5.5 only. The last band was active in pH 7.0, 7.5 and 8.0, in the presence of DTT. The third band (M_r between 14.3 kDa – 18.4 kDa) in *Acanthamoeba castellanii*, was observed to be inhibited by PMSF and Antipain, suggesting that the enzymes is a serine-sistein proteinases type; this enzyme is active at higher pHs and not DTT-dependant. The second band ($M_r > 43$ kDa) of proteinases in *Acanthamoeba sp*, was observed to be inhibited by antipain and E-64, probably belongs to the cystein group; the activity of this band is high at pHs 7.5 and 8.0, without DTT-dependant. The first, second and third bands in *Acanthamoeba polyphaga* were observed to be inhibited by PMSF and Antipain, indicating the enzyme probably belong to the serine proteinases group. The result shows that the types and the number of proteinases are different in three species of *Acanthamoeba spp*. The different occur because of different species may have different physiology.