

MODIFIKASI SINTESIS NUKLEOTIDA BERTANDA [α - ^{32}P]ATP

Wira Y Rahman^{1*}, Endang Sarmini, Herlina, Triyanto, Hambali, Abdul Mutalib,
²Santi Nurbaiti

¹ Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) - BATAN)

² Kelompok Keahlian Kimia ITB

*Tel/fax : (021)7563141, email: wira@batan.go.id

ABSTRAK

MODIFIKASI SINTESIS NUKLEOTIDA BERTANDA [Y - ^{32}P]ATP. Dalam perkembangan biologi molekul, radionuklida dalam bentuk senyawa bertanda telah digunakan sebagai perunut *deoxyribonucleic acid (DNA)/ribonucleic acid (RNA)* untuk mendalami berbagai macam proses fisiologi dan patologi. Salah satu senyawa tersebut adalah nukleotida bertanda fosfor-32 (^{32}P) [^{32}P]-adenosine triphosphate {[^{32}P]-ATP} yang banyak digunakan dalam penelitian biologi molekul. Untuk dapat menunjang penelitian biologi molekul di Indonesia, pada penelitian ini telah dilakukan pembuatan senyawa nukleotida bertanda [^{32}P]-ATP melalui reaksi enzimatik dengan melakukan modifikasi pada metoda sintesisnya menggunakan prekursor DL-glyceraldehyde 3-phosphate, nukleotida adenosine di-phosphate (ADP) dan $H_3^{32}PO_4$, serta enzim gliseraldehid 3-phosphat dehidrogenase, 3-phosphogliserat-kinase dan laktat dehidrogenase. Pemurnian [^{32}P]-ATP hasil sintesis dengan menggunakan kolom kromatografi DEAE-*Sephadex*. Dari proses sintesis dan pemurnian yang telah dilakukan berhasil diperoleh [^{32}P]-ATP dengan aktifitas 1,175 mCi dan kemurnian radiokimia 99,49%. Dengan berhasilnya dilakukan sintesis dan pemurnian [^{32}P]-ATP, maka Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka akan dapat menyediakan nukleotida bertanda dimaksud di atas untuk menunjang penelitian biologi molekul di Indonesia.

Kata Kunci: nukleotida bertanda [^{32}P]ATP, sintesis, reaksi enzimatik, pemurnian

ABSTRACT

MODIFICATION OF SYNTHESIS NUCLEOTIDES [Y - ^{32}P] ATP. In molecular biology, radionuclides in the form of radiolabeled compounds have been widely used as deoxyribonucleic acid (DNA) / ribonucleic acid (RNA) tracer in order to explore a wide range of physiological and pathological processes. One of such compounds is [^{32}P]-adenosine triphosphate {[^{32}P]-ATP} [^{32}P]-ATP which has been widely used in the biotechnology research. In order to support the biotechnology research in Indonesia in this project, [^{32}P]-ATP had been synthesized by enzymatic reactions with modifying the method of synthesis using the precursor DL-glyceraldehyde 3-phosphate, nucleotides Adenosine Diphosphate (ADP) and $H_3^{32}PO_4$ and enzymes glyceraldehid 3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglyceric phosphokinase and lactate dehydrogenase. The purification of the synthesized [^{32}P]-ATP, by using DEAE Sephadex column chromatography. The synthesis and purification process that had been performed were able in producing of [^{32}P]-ATP with radioactivity of 1,175 mCi and radiochemical purity of 99,49%.. Having successfully prepared the [^{32}P]-ATP and application, in the near future the Radioisotopes and Radiopharmaceuticals Centre is expected to be able in providing the above-mentioned radiolabeled nucleotide for biotechnology research in Indonesia.

Key words : labeled nucleotide [^{32}P]-ATP, synthesis, enzymatic reaction, purification

PENDAHULUAN

Pemanfaatan teknologi nuklir untuk kesejahteraan manusia telah merambah berbagai bidang kehidupan seperti kesehatan, industri, riset kebumihan, energi, pangan dan pertanian, ilmu fisika dan kimia, serta kelautan dan hidrologi, dan lain-lain. Selama dekade terakhir ini aplikasi radioisotop telah berkembang dengan cepat, tidak hanya digunakan dalam pencitraan untuk memperoleh informasi fungsional suatu senyawa, melainkan juga untuk mendalami berbagai proses fisiologi dan patologi. [1,2,3]

Salah satu aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan yang dikombinasikan dengan teknik biologi molekuler adalah deteksi virus hepatitis C. Deteksi ini dilakukan melalui penentuan urutan asam nukleat DNA virus menggunakan teknik *polymerase chain reaction (PCR)* dan hibridisasi *dot blot*. Teknik hibridisasi membutuhkan pelacak (*probe*) yang berperan untuk mendeteksi fragmen DNA virus yang spesifik tersebut. Pelacak merupakan asam nukleat rantai pendek beruntai tunggal (untai tunggal RNA atau DNA) yang memiliki sekuen spesifik yang akan dideteksi dan berlabel radioaktif P-32, salah satunya adalah [³²P]ATP [4,5,6]. Teknik penggunaan pelacak DNA/RNA untuk mendeteksi gen atau fragmen DNA yang diinginkan atau untuk mendeteksi klon yang benar dikenal dengan nama teknik *Southern Blotting* [7,8,9].

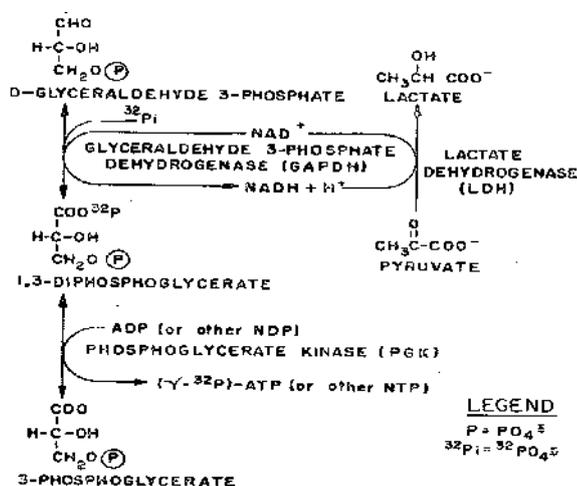
Tahap awal metode *Southern Blotting* adalah pemotongan DNA dengan enzim restriksi endonuklease sehingga terbentuk fragmen-fragmen DNA yang lebih kecil. Kemudian DNA dipisahkan berdasarkan ukuran dengan menggunakan

elektroforesis agarosa. Setelah DNA terpisah, dilanjutkan dengan tahap *blotting* yaitu pemindahan DNA dari gel agarosa ke membran nitroselulosa. Proses transfer dilakukan dengan meletakkan membran nitroselulosa pada bagian atas gel agarosa. Pada teknik *blotting* yang menggunakan vakum, membran diletakkan pada bagian bawah gel. Tekanan diberikan secara merata pada gel untuk memastikan terjadi kontak antara gel dengan membran. Proses transfer berlangsung dengan memanfaatkan daya kapilaritas. Setelah DNA ditransfer ke membran, membran nitroselulosa dipanaskan pada suhu tinggi (60-100°C) kemudian diradiasi sinar UV sehingga terbentuk ikatan kovalen antara pita-pita DNA dengan membran. Selanjutnya, membran dicampur dengan pelacak yang telah dilabel radioaktif dan dilanjutkan dengan inkubasi sehingga terjadi proses hibridisasi. Pelacak akan mengikat bagian-bagian yang merupakan komplemennya pada DNA dan "melekat" pada membran. Setelah proses hibridisasi, pelacak yang tidak terikat dicuci dari membran sehingga yang tertinggal hanya hibrid pelacak-DNA di membran. Pola hibridisasi kemudian dideteksi dengan visualisasi pada film X-ray melalui autoradiografi [7,8,9]. Hanya bagian-bagian dari sampel tempat lokasi gen yang terlihat sebagai titik gelap pada film, karena pada bagian tersebut terikat pelacak radioaktif.

Penelitian ini bertujuan untuk membuat senyawa nukleotida bertanda [^{γ-32}P]ATP yang akan digunakan untuk penelitian dalam bidang biologi molekuler. Sintesis [^{γ-32}P]ATP dilakukan menggunakan reaksi enzimatik.

Pada proses sintesis nukleotida bertanda P-32 telah dilakukan dengan menggunakan metoda yang dikembangkan oleh Sakamoto^[10] yaitu memanfaatkan sebagian jalur glikolisis. Ternyata rendemen hasil sintesis yang diperoleh hanya mencapai 33,46 %, maka untuk mendapatkan hasil yang lebih optimal dilakukan modifikasi metoda berdasarkan metoda yang digunakan oleh Schendell & Wells^[11], dengan memperpendek proses sintesis

yang dilakukan oleh Sakamoto dengan menggunakan DL-gliseraldehid 3-fosfat. Pada metoda ini digunakan oxidizing dyes untuk merubah molekul NAD^+ menjadi NADH , karena oxidizing dyes tersebut fungsinya sama dengan lactate dehydrogenase, maka oxidizing dyes tersebut diganti dengan lactate dehydrogenase yang akan merubah molekul NAD^+ menjadi NADH , seperti ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Modifikasi proses Schendell & Wells dengan menggunakan enzim lactate dehydrogenase

Dalam metoda ini proses sintesis nukleotida bertanda P-32 dimulai dari DL-gliseraldehid 3-fosfat, yang bereaksi dengan asam fosfat ($\text{H}_3\text{^{32}PO}_4$) menghasilkan 1,3-difosfogliseraldehid. Senyawa 1,3-difosfogliseraldehid berubah menjadi asam 1,3-difosfogliserat dengan bantuan enzim gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenase, kofaktor ion Mg^{++} serta koenzim NAD^+ . Selama reaksi berlangsung molekul NAD^+ akan berubah menjadi NADH . Molekul NADH ini dengan bantuan enzim laktat dehidrogenase akan berubah kembali menjadi NAD^+ disertai perubahan asam piruvat menjadi asam laktat. Senyawa 1,3-difosfogliserat selanjutnya

berubah menjadi 3-fosfogliserat dengan bantuan enzim fosfogliserat kinase, disertai dengan perubahan ADP menjadi ATP. Kemudian dilakukan pemurnian dengan menggunakan kromatografi penukar anion DEAE-Sephadex.

Seiring dengan perkembangan biologi molekul di Indonesia maka kebutuhan akan senyawa nukleotida bertanda untuk perunut menjadi sangat penting. Untuk itu penguasaan teknik sintesis nukleotida bertanda akan sangat mendukung peningkatan kemampuan di bidang biologi molekul.

TATA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah $H_3^{32}PO_4$ bebas pengemban dengan kemurnian radiokimia diatas 97%. Enzim gliseraldehid-3-phosphat dehidrogenase (80 unit/mg) 10 mg/ml, phosphogliserat kinase (450 unit/mg) 10 mg/ml, dithiothreitol, tris-HCl, etilendiamintetraasetat (EDTA), DL-gliseraldehid 3-fosfat dari Sigma Aldrich. Sedangkan laktat dehidrogenase (250 unit/mg) 5 mg/ml, adenosin difosfat (ADP), -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), magnesium klorida dari Merck.

Bahan penunjang yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu kolom kromatografi *Dowex AG 50* (1x8), kolom kromatografi *DEAE-Sephadex* dengan pendingin, kromatografi lapisan tipis (KLT), plastik *polyethyleneimine* (PEI) *cellulose* dari E.Merck, kertas indikator pH universal, peralatan gelas dan tabung mikro.

Peralatan yang digunakan yaitu sentrifuga berpendingin (*refrigerated centrifuge*) (Allegra Beckman Coulter), penangas air (Memmert), Mini TLC Scanner (Bioscan AR-2000), dan *Liquid Scintillation Counter* (LSC) (MicroBeta Trilux).

Cara Kerja Metoda Pertama

1. Preparasi campuran yang digunakan
2. Pembuatan larutan campuran A : 100 μ l campuran berikut ini dibuat dalam satu tabung mikro:

500 mM	Tris-HCl	}	50 μ l
120 mM	Magnesium Klorida		
1 mM	EDTA		
125 mM	Natrium piruvat		20 μ l
200 mM	Dithiothreitol		15 μ l
20 mM	Fructose 1,6-bisphosphate		5 μ l
5 mM	ADP		5 μ l
20 mM	-NAD		5 μ l

3. Preparasi pereaksi campuran untuk buffer pelet enzim. Pembuatan larutan campuran B : 50 μ l larutan berikut disiapkan dalam satu tabung mikro:

500 mM	Tris-HCl	}	5 μ l
120 mM	Magnesium Klorida		
1 mM	EDTA		
200 mM	Dithiothreitol		1,5 μ l
	air		43,5 μ l

4. Preparasi campuran enzim. Pembuatan campuran enzim : 12 μ l campuran enzim berikut dibuat didalam satu tabung mikro:

Aldolase	6 μ l	(0,54 units)
Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	2 μ l	(1,6 units)
Lactate dehydrogenase	2 μ l	(2,5 units)
3-phosphoglycerate kinase	2 μ l	(0,9 units)

Campuran enzim tersebut disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama 20 menit , setelah diambil supernatannya, endapan enzim kemudian dilarutkan dengan 10 μ l larutan campuran B.

5. Proses pemisahan hasil sintesis [$-^{32}P$]ATP Hasil proses penandaan dipisahkan dengan menggunakan kolom DEAE-Sephadex yang telah dikondisikan dengan larutan NH_4HCO_3 . Kolom dielusi dengan 16 ml NH_4HCO_3 0,01 M dengan tujuan menghilangkan enzim. Kemudian kolom dielusi dengan 10 ml NH_4HCO_3 0,1 M dengan tujuan menghilangkan sisa ADP dan ATP yang

tidak bereaksi. Kolom dielusi kembali dengan 15 ml NH_4HCO_3 0,23 M bertujuan untuk menghilangkan P-32 yang tidak bereaksi didapatkan fraksi 1 – 10, masing-masing fraksi 1,5 ml. ATP yang telah tertandai P-32, [^{32}P]ATP selanjutnya dielusi dari kolom dengan 10 ml NH_4HCO_3 0,4 M (fraksi 22 – 26). Aktivitas masing-masing fraksi diukur dan dibuat grafik antara aktivitas terhadap nomor fraksi. Puncak ATP ditentukan dengan LSC dan TLC *PEI Cellulose*.

6. Pengujian/Karakterisasi hasil sintesis [^{32}P]ATP Hasil penandaan dikarakterisasi dengan TLC *PEI Cellulose* sebagai fasa diam dan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa gerak. Kemudian ditentukan R_f -nya dengan *Bioscanner*

Cara Kerja Metoda Kedua

1. Preparasi campuran yang digunakan. Pembuatan larutan campuran A: 100 μL campuran berikut ini dibuat dalam satu tabung mikro

	Air (aquabidest)	25 μl
0,5 M	Tris-HCl	50 μl
0,3 M	Magnesium Klorida	20 μl
0,125 M	Natrium piruvat	12,5 μl
5 mM	ADP	12,5 μl
0,2 M	Dithiothreitol	30 μl
0,02 M	DL-glyceraldehyde	25 μl
20 mM	-NAD	25 μl

2. Preparasi pereaksi campuran untuk buffer pelet enzim. Pembuatan larutan campuran B: 50 μL larutan berikut disiapkan dalam satu tabung mikro

	Air	42,5 μl
0,5 M	Tris-HCl	2,5
0,3 M	Magnesium Klorida	2,5 μl
0,2 M	Dithiothreitol	2,5 μl

3. Preparasi campuran enzim. Pembuatan campuran enzim : 12 μL campuran enzim berikut dibuat didalam satu tabung mikro

Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase	50 μl	(40 units)
Lactate dehydrogenase	50 μl	(62,5 units)
3-phosphoglycerate phosphokinase	50 μl	(225 units)

Campuran enzim tersebut disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama 20 menit. Setelah diambil supernatannya, endapan enzim kemudian dilarutkan dengan 50 μL larutan campuran B.

4. Proses sintesis [^{32}P]ATP

Ke dalam tabung mikro bervolume 1,5 ml dimasukkan 40 μl $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (aktivitas terukur) diatur pH 7-9 dengan larutan 5M NaOH. Selanjutnya ke dalam larutan tersebut ditambahkan berturut-turut 40 μl larutan campuran A dan 10 μl campuran enzim. Inkubasi dilakukan selama (t) menit dan dicuplik setiap waktu tertentu selama 1 jam. Reaksi dihentikan dengan memasukkan tabung mikro ke dalam penangas air bersuhu 70 C selama 3 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik. Kemudian dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan kolom penukar ion DEAE-Sephadex.

5. Proses pemisahan [^{32}P]ATP hasil sintesis

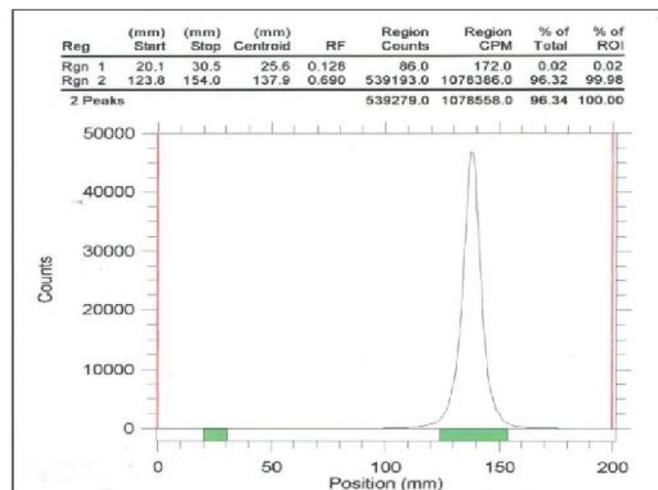
6. Pengujian/Karakterisasi hasil sintesis [^{32}P]ATP

HASIL DAN PEMBAHASAN

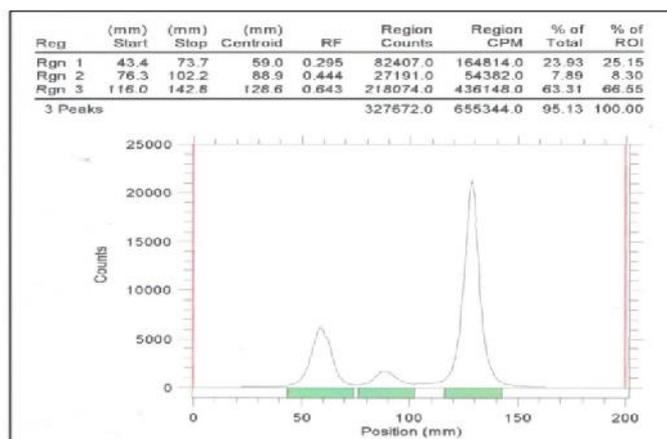
Dalam proses penyiapan [^{32}P]ATP dibutuhkan ^{32}P dalam bentuk $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$, maka hal pertama yang dilakukan adalah melakukan uji kualitas $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang akan digunakan dalam proses sintesis yang dimaksud di atas. Hal ini dilakukan karena radionuklida ^{32}P berupa larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (dalam bentuk orto-fosfat) cenderung tidak stabil dalam penyimpanan dan mudah berubah menjadi senyawa polifosfat. Pemurnian radioisotop P-32 menggunakan kolom kromatografi penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) yang telah dikondisikan dengan HCl 0,1M, sehingga diperoleh larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dengan kemurnian radiokimia yang tinggi dan layak digunakan untuk pembuatan nukleotida bertanda [^{32}P]ATP. Analisa kemurnian radiokimia $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dilakukan dengan sistem KLT, dengan menggunakan *PEI Cellulose* sebagai fasa diam dan

larutan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa gerak, Dari proses pemurnian radioisotop $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ tersebut diperoleh kemurnian radiokimianya >97%, dengan R_f 0,690 seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

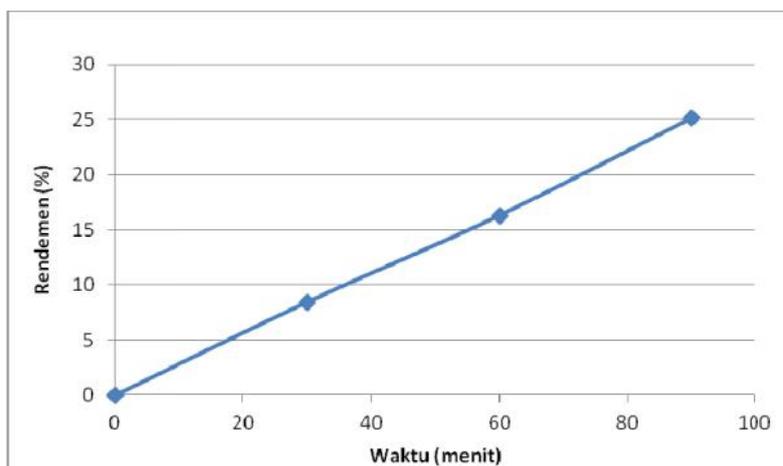
Dilakukan proses sintesis nukleotida bertanda P-32 dengan metoda pertama menggunakan radioisotop P-32 yang telah dimurnikan dengan aktivitas 3,15 mCi sebanyak 200 μL , dengan lama waktu inkubasi 90 menit. Setiap 30 menit dicuplik untuk melihat nukleotida [^{32}P]ATP yang terbentuk, hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3. diperoleh rendemen 25,13 % dengan R_f 0,295 setelah waktu inkubasi 90 menit. Rendemen pembentukan nukleotida bertanda P-32 [^{32}P]ATP setiap 30 menit selama waktu inkubasi 90 menit dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 2. Radiokromatogram P-32 hasil pemurnian



Gambar 3. Radiokromatogram hasil sintesis nukleotida bertanda P-32 [^{32}P]ATP dengan waktu inkubasi 90 menit



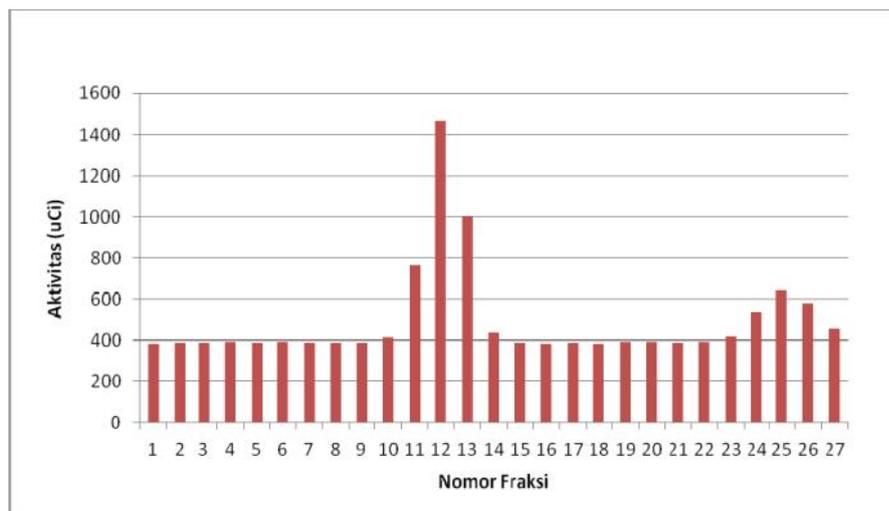
Gambar 4. Rendemen pembentukan nukleotida bertanda P-32 [^{32}P]ATP dengan waktu inkubasi selama 90 menit

Dari Gambar 4 terlihat ada peningkatan rendemen seiring dengan bertambahnya waktu inkubasi, tetapi rendemen yang diperoleh masih rendah, 25,15% dengan waktu inkubasi yang telah mencapai 90 menit. Sementara dari literatur diketahui bahwa rendemen pembentukan bisa mencapai 95% dalam waktu 5 menit. Kemungkinannya pemecahan fruktosa-1,6-disfosfat oleh enzim aldolase menjadi Glyceraldehide 3-phosphate tidak optimal, yang akan mempengaruhi jumlah perubahan ADP menjadi ATP bertanda P-32.

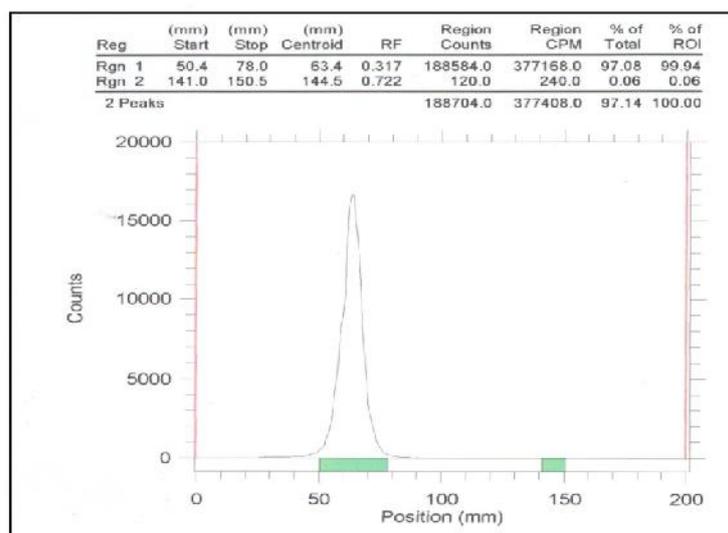
Kemudian dilakukan pemisahan dengan menggunakan kolom DEAE Sephadex yang telah dikondisikan dengan larutan NH_4HCO_3 0,01 M, pH 7,5. Kolom kemudian berturut-turut dielusi dengan larutan NH_4HCO_3 0,01 M untuk menghilangkan sisa enzim, larutan NH_4HCO_3 0,1 M untuk menghilangkan ADP dan ATP yang tidak bereaksi, larutan NH_4HCO_3 0,23 M untuk menghilangkan P-32 yang tidak bereaksi. Kolom kemudian dielusi dengan larutan NH_4HCO_3 0,4 M untuk mendapatkan nukleotida yang telah bertanda P-32, [^{32}P]ATP.

Hasil fraksinasi proses pemisahan sintesis nukleotida bertanda P-32 dengan waktu inkubasi selama 90 menit dapat dilihat pada Gambar 5. Fraksi 11 sampai 14 adalah P-32 yang tidak berekasi, sedangkan fraksi 24, 25 dan 26 adalah nukleotida bertanda P-32.

Untuk menentukan kemurnian hasil pemisahan dilakukan analisa dengan menggunakan KLT PEI *cellulose* sebagai fasa diam dan larutan KH_2PO_4 pH 3,5 sebagai fasa gerak. Hasil radiokromatogram nukleotida bertanda P-32 pada R_f 0,317 diperoleh 99,94 % seperti pada Gambar 6.



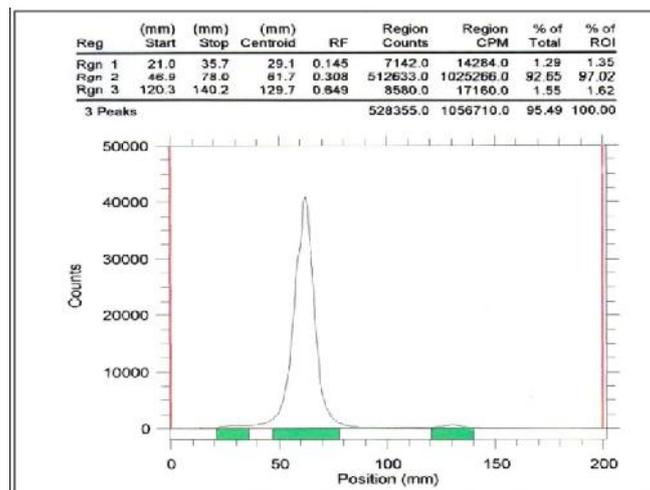
Gambar 5. Hasil fraksinasi proses pemisahan sintesis nukleotida bertanda P-32 dengan waktu inkubasi selama 90 menit



Gambar 6. Radikromatogram nukleotida bertanda P-32 hasil pemisahan fraksi 25 dengan waktu inkubasi 90 menit

Tabel 1. Aktivitas dan kemurnian radiokimia yang diperoleh masing-masing fraksi

Fraksi	24	25	26
Aktivitas (μCi)	533	642	577
Kemurnian (%)	99,88	99,96	99,96



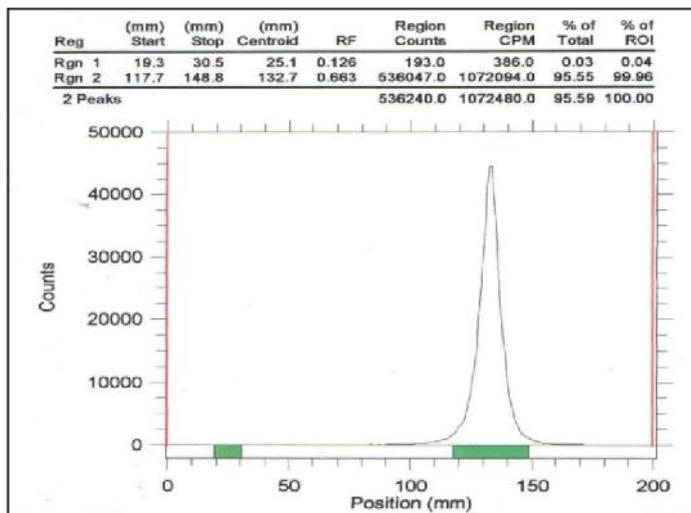
Gambar 7. Radikromatogram nukleotida bertanda P-32 setelah proses pencucian dan pelarutan dengan Tricine

Masing-masing fraksi kemudian disatukan dan dimurnikan dengan mengeringkan dalam freeze dryer, kemudian dilarutkan dengan 1 ml aquabides dan kembali dikeringkan dengan freeze dryer, pencucian dengan aquabides dilakukan 2 kali. Hasil pengeringan kemudian dilarutkan dengan 0,05 M Tricine pH 7,6, sebanyak 25 μL , dicuplik 2,5 μL untuk dianalisa dengan menggunakan TLC PEI Cellulose, diperoleh hasilnya dengan aktivitas 4,96 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$ dengan kemurnian 97,02%, hasil radiokromatogramnya yang ditunjukkan pada Gambar 7.

Dari metoda pertama tersebut memberikan rendemen [^{32}P]ATP hanya sampai 25,15% dengan waktu inkubasi mencapai 90 menit, sehingga dianggap proses sintesis tersebut kurang berhasil, maka dilakukan proses sintesis dengan

menggunakan metoda kedua, metoda Schendel & Wells yang telah dimodifikasi.

Pada metoda Schendel & Wells ini pada campuran pereaksinya tidak menggunakan larutan EDTA, karena larutan EDTA tersebut digunakan untuk menghentikan reaksi enzimatik, sementara dalam metoda Sakamoto digunakan larutan EDTA dalam campuran perkasinya, kemungkinan larutan EDTA ini menghambat laju reaksi enzimatik sehingga rendemennya menjadi rendah. Sintesis dimulai dari DL- Glyceraldehyde 3-phosphate dengan menggunakan tiga campuran enzim yaitu lactate dehydrogenase, Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase serta 3-phosphoglycerate phosphokinase. Larutan H_3PO_4 yang digunakan harus dimurnikan terlebih dahulu.

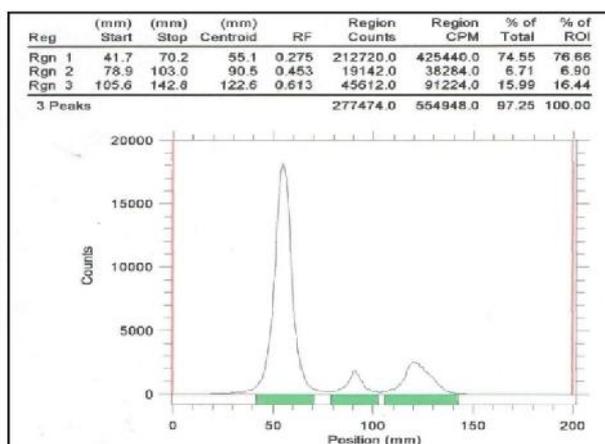


Gambar 8. Radiokromatogram larutan $H_3^{32}PO_4$ setelah proses pemurnian

Radiokromatogram dari $H_3^{32}PO_4$ yang telah dimurnikan dengan kolom penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) yang akan digunakan untuk proses sintesis nukleorida bertanda P-32 dapat dilihat pada gambar 8.

Kemudian dilakukan proses sintesis nukleotida bertanda $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ menggunakan radioisotop P-32 dengan aktivitas 3,76 mCi, sebanyak 200 μL , dengan memperpendek proses sintesis dan pengurangan enzim aldolase serta

menggunakan DL- Glyceraldehyde 3-phosphate sebagai bahan utamanya. Pembentukan $[\text{-}^{32}P]ATP$ diamati dengan cara mencuplik sejumlah tertentu sampel setiap 15 menit reaksi yang kemudian dianalisis dengan sistim KLT dengan menggunakan PEI *Cellulose* sebagai fasa diam dan larutan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa gerak. Rendemen pembentukan nukleotida bertanda P-32 pada saat 15 menit inkubasi mencapai 76,66%, R_f 0,275 ditunjukkan pada Gambar 9.

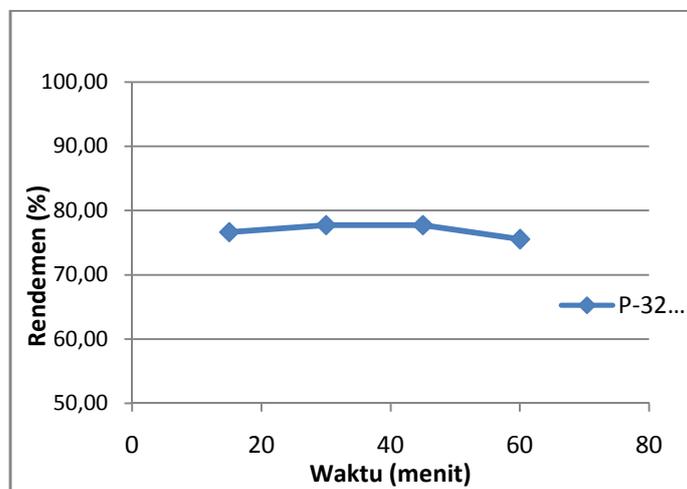


Gambar 9. Radiokromatogram pembentukan $[\text{-}^{32}P]ATP$ setelah inkubasi 15 menit

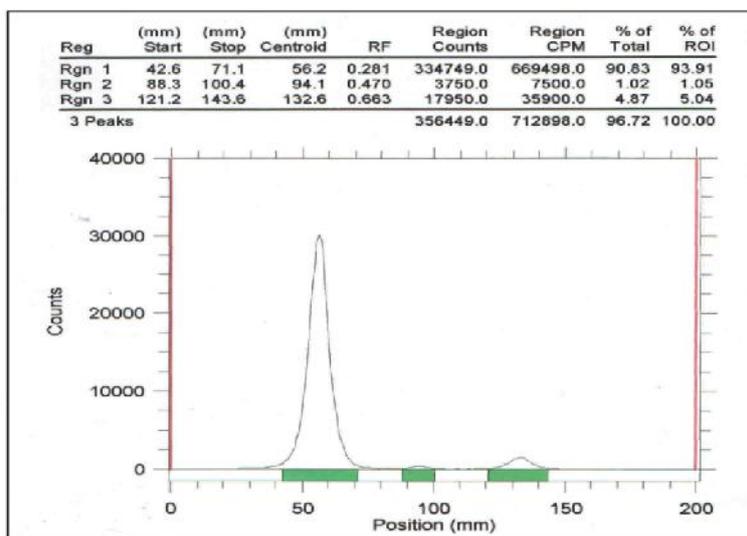
Dari kromatogram yang sama juga dapat dilihat masih terdapat 16,44% $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (R_f 0,613) bebas atau yang tidak terikat pada ATP. Inkubasi dilakukan selama 60 menit dan dicuplik setiap 15 menit, rendemen pembentukan nukleotida bertanda [^{32}P]ATP ditunjukkan pada gambar 10.

Terlihat pada menit ke-30 terjadi sedikit kenaikan rendemennya, tetapi sampai menit ke-60 tidak terjadi kenaikan yang cukup signifikan, malah

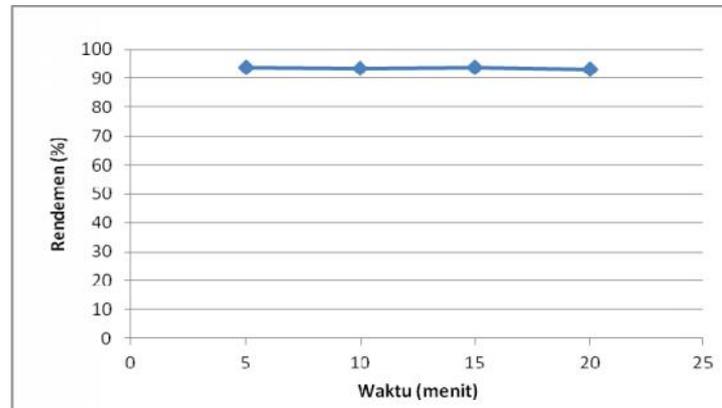
terjadi sedikit penurunan, maka proses sintesis diulang lagi dengan mempendek waktu sintesis menjadi 20 menit dengan selang waktu pencuplikan setiap 5 menit. Aktivitas yang digunakan untuk proses sintesis ini 3,99 mCi sebanyak 200 μL , ternyata dalam waktu 5 menit rendemen pembentukan nukleotida bertanda [^{32}P]ATP mencapai 93,91%, terlihat dari kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 11.



Gambar 10. Rendemen pembentukan nukleotida bertanda P-32 [^{32}P]ATP dengan waktu inkubasi selama 60 menit



Gambar 11. Radiokromatogram pembentukan [^{32}P]ATP setelah inkubasi 5 menit



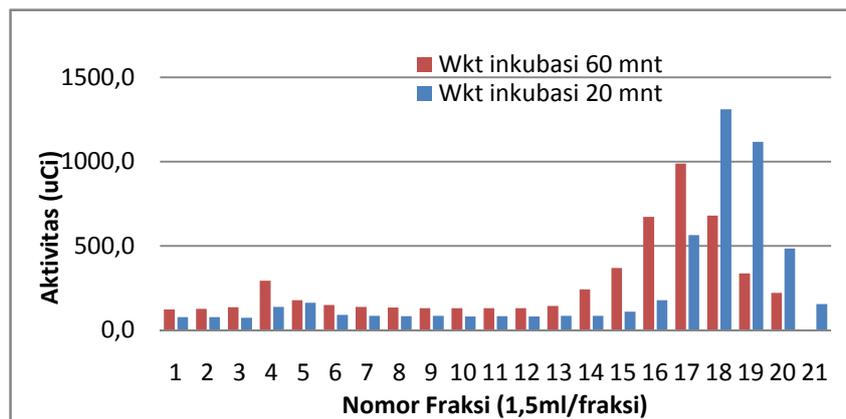
Gambar 12. Rendemen hasil inkubasi setiap 5 menit pencuplikan

Dari kromatogram ini dapat dilihat persentase rendemen hasil sintesis [^{32}P]ATP sebesar 93,91%, (R_f 0,281). Dari kromatogram yang sama juga dapat dilihat masih terdapat 5,04% $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (R_f 0,663) bebas atau yang tidak terikat pada ATP. Waktu yang optimal untuk inkubasi pembentukan nukleotida bertanda P-32 [^{32}P]ATP adalah 5 menit, karena dengan bertambahnya waktu tidak menambah rendemen pembentukannya seperti yang ditunjukkan gambar 12.

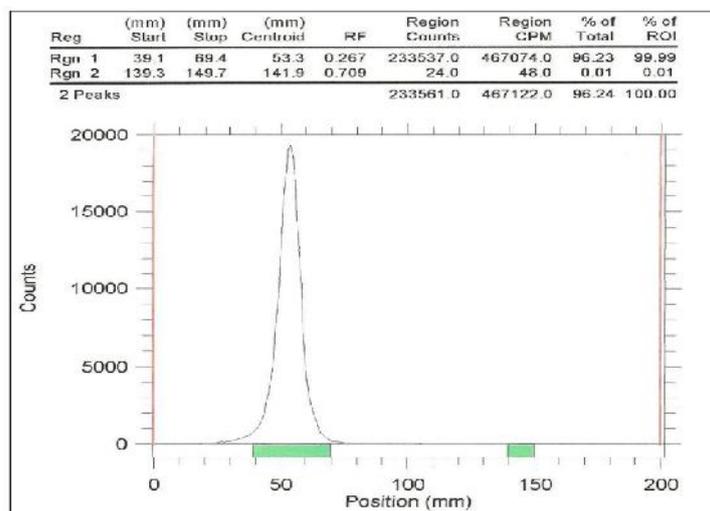
Untuk mendapatkan [^{32}P]ATP dengan kemurnian radiokimia > 90%, dilakukan proses pemisahan dengan menggunakan larutan $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ pH 7,5 dengan konsentrasi 0,01 M; 0,1 M; 0,23 M dan 0,4 M sebagai eluen. Pada proses pemurnian ini [^{32}P]ATP masing-masing hasil sintesis dilewatkan ke dalam kolom DEAE-Sephadex yang telah dikondisikan dengan 10 mL NH_4HCO_3 0,01 M. Kolom kemudian berturut-turut dielusi dengan 20 mL NH_4HCO_3 0,01 M untuk menghilangkan enzim, dengan 10 mL NH_4HCO_3

0,1M untuk menghilangkan ADP dan ATP yang tidak bereaksi dan dengan 15 mL NH_4HCO_3 0,23 M untuk menghilangkan P-32 yang tidak bereaksi. Kolom kemudian dielusi dengan 10 mL NH_4HCO_3 0,4 M untuk mendapatkan ATP yang telah tertandai P-32, [^{32}P]ATP.

Gambar 13 memperlihatkan profil elusi pemurnian [^{32}P]ATP dengan kolom kromatografi penukar anion DEAE Sephadex menggunakan NH_4HCO_3 sebagai eluen. Hasil analisa fraksi-fraksi hasil elusi dengan KLT menggunakan PEI *Cellulose* sebagai fasa gerak dan larutan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa diam memperlihatkan bahwa fraksi 4, 5 dan 6 merupakan P-32 bebas yang tidak bereaksi menjadi [^{32}P]ATP ($R_f = 0,6$). Sementara itu fraksi 17, 18, 19 dan 20 merupakan fraksi [^{32}P]ATP dengan kemurnian radiokimia >90%. Gambar 14 memperlihatkan kromatogram salah satu fraksi yang dimaksud diatas (fraksi 19), [^{32}P]ATP ($R_f = 0,267$), dengan kemurnian radiokimia 99,99%.



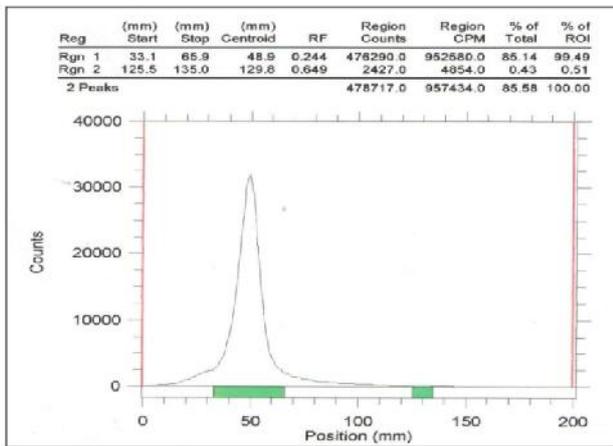
Gambar 13. Profil elusi pemisahan [^{32}P]ATP dengan kolom kromatografi penukar anion DEAE Sephadex menggunakan NH_4HCO_3 sebagai larutan pengelusi



Gambar 14. Radiokromatogram fraksi 19 dari hasil proses pemisahan [^{32}P]ATP menggunakan kolom penukar anion DEAE Sephadex dan NH_4HCO_3 sebagai eluen

Masing-masing fraksi dengan kemurnian diatas 95% dikumpulkan, kemudian dimurnikan dengan mengeringkan dalam freeze dryer, kemudian dilarutkan dengan 3 ml aquabides dan kembali dikeringkan dengan freeze dryer, pencucian dengan aquabides dilakukan 3 kali. Hasil pengeringan

kemudian dilarutkan dengan 0,05 M Tricine pH 7,6, sebanyak 300 μL dengan aktivitas 1,175 mCi, dicuplik 2,5 μL untuk dianalisa dengan menggunakan TLC PEI Cellulose kemurnian radiokimianya 99,49 %, hasil radiokromatogramnya ditunjukkan pada Gambar 15.



Gambar 15. Radikromatogram nukleotida bertanda P-32 hasil pemisahan setelah proses pencucian dan pelarutan dengan Tricine

Dari kedua metoda yang sudah dilakukan metoda kedua yaitu modifikasi dari metoda Schendel & Wells jauh lebih baik hasilnya, dengan waktu inkubasi yang lebih singkat (optimal pada 5 menit pada aktivitas yang sama). Rendemen hasil sintesis setelah proses pengkondisian dengan tricine kemurnian radiokimianya juga lebih baik mencapai 99,49%, sementara dari metoda yang digunakan oleh Sakamoto 97,02%.

KESIMPULAN

Sebelum larutan $H_3^{32}PO_4$ digunakan untuk proses sintesis $[^{-32}P]ATP$ terlebih dahulu dilakukan pemurnian dengan cara melewati $H_3^{32}PO_4$ ke dalam kolom penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) yang telah dikondisikan dengan HCl 0,1M. Diperoleh kemurnian radiokimia $H_3^{32}PO_4 > 99%$ setelah proses pemurnian ini. Rendemen sintesis dengan menggunakan metoda yang dilakukan oleh Sakamoto memberikan hasil 25,15% dengan waktu inkubasi 60 menit. Sementara itu hasil sintesis $[^{-32}P]ATP$ dengan menggunakan metoda yang dimodifikasi dan sebagai bahan utamanya DL-gliseraldehid 3-fosfat memberikan rendemen 93,91% dengan waktu inkubasi optimum selama 5 menit. Untuk mendapatkan $[^{-32}P]ATP$ dengan kemurnian radiokimia yang memenuhi syarat untuk dapat digunakan pada aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan ($> 95%$), *raw product* dimurnikan dengan sistim kromatografi dengan menggunakan kolom DEAE-Sephadex dengan menggunakan eluen NH_4HCO_3 . Proses pemurnian $[^{-32}P]ATP$ dengan menggunakan eluen NH_4HCO_3 memberikan hasil $[^{32}P]-ATP$ 1,175 mCi dengan kemurnian radiokimianya $\sim 99,49%$.

DAFTAR PUSTAKA

1. **FATCHIYAH dan ESTRI LARAS ARUMNINGTYAS.** "Kromosom, Gen, DNA, Synthesis Protein dan Regulasi", Laboratorium Biologi Molekuler dan Selluler Universitas Brawijaya, Malang, 2006
2. **NUNUK PRIYANI,** "Sifat Fisik dan Kimia DNA", Program Studi Biologi dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, 2004
3. **DWI SURYANTO,** "Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler", Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara.
4. **SUHARSONO,** "Struktur dan Ekspresi Gen", Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
5. **LEHRINGER, A.L,** "Dasar-Dasar Biokimia Jilid I", Erlangga, Jakarta, 1982
6. **ARIS TIAHJOLEKSONO,** "Teknologi DNA Rekombinan", Jurusan Biologi FMIPA, Institut Pertanian Bogor.
7. **MUKH. SYAIFUDIN dan DEVITA TETRIANA,** "Analisis Mutasi Gen inhA untuk Uji Resistensi M.Tuberculosis terhadap

Isoniazid dengan Metode SSCP radioaktif”, Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi, BATAN, Jakarta.

8. **MARIA LINA R, BUDIMAN BELA dan ANDI YASMON**, “Deteksi Mutasi Gen KATG (*MyobacteriumTuberculosis*) dengan Metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) – Hibridisasi *Dot Blot* menggunakan Pelacak Oligonukleotida Bertanda ^{32}P ”, Jurnal Aplikasi Isotop dan Radiasi, 2000.
9. **BUDIAWAN**, “Pengembangan Teknik ^{32}P -Postlabelling untuk Mendeteksi Dini Resiko Kanker”, Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi, 2000.
10. **F. SAKAMOTO, M. IZUMO, K. HASHIMOTO, Y. FUJI**, “Study of Optimum Condition for Synthesis of [^{32}P]ATP with High Specific Radioactivity”, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, Vol. 239, No.2 (1999) 423-427.
11. **PAUL F. SCHENDEL and ROBERT D. WELLS**, “The Synthetic and Purification of [^{32}P] Adenosine Triphosphate with High Specific Activity”, The Journal of Biology Chemistry, Vol. 248, No. 23, Issue of December 10.
12. **WIRA Y RAHMAN, ENDANG SARMINI, HERLINA**, dkk, “ Sintesis ATP Bertanda P-32 sebagai Perunut Biologi Molekul”, Pertemuan Ilmiah Radioisotop, Radiofarmaka dan Siklotron, 2010.2