

## STUDI PENDAHULUAN BIOSINTESIS, ISOLASI DAN PEMURNIAN SENYAWA BERTANDA L-<sup>35</sup>S-METIONIN

### PRELIMINARY STUDY ON BIOSYNTHESIS, ISOLATION AND PURIFICATION OF L-<sup>35</sup>S-METHIONINE LABELLED COMPOUNDS

Nanny Kartini Oekar

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknik Nuklir - BATAN, Bandung

#### ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian pendahuluan biosintesis asam amino bertanda radioisotop sulfur-35, yaitu L-<sup>35</sup>S-metionin menggunakan ragi *Saccharomyces cerevisiae* strain liar dari Baker sebagai mikroba pembentuk (produsen), dan larutan radioisotop Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> (45 mCi/60 µL) sebagai sumber zat perunut ditambah ke dalam media garam agar proses inkorporasi radioisotop S-35 terhadap sel ragi berlangsung.

Inkorporasi S-35 pada sel ragi yang tertinggi sebesar 93,5 % diperoleh setelah diinkubasi selama 10 jam pada temperatur 30°C. Untuk memecahkan sel ragi supaya L-<sup>35</sup>S-metionin dan asam amino lainnya terlepas ke dalam larutan, dilakukan hidrolisis menggunakan HCL 6N dan dipanaskan pada temperatur 110°C selama 18 jam. Isolasi hidrolisat dilakukan dua tahap dengan kromatografi kolom menggunakan penjerap Dowex-penukar kation dengan dua macam larutan pengelusi yaitu air steril bebas mineral yang mengandung 0,1 % β-merkpto etanol (ME), dan campuran air : HCl 4N juga mengandung 0,1 % ME. Perbandingan volume antara keduanya diatur secara *gradien*.

Setelah dimurnikan melalui kromatografi kolom, larutan L-<sup>35</sup>S-Metionin dianalisis dengan kromatografi kertas, hasil menunjukkan bahwa senyawa bertanda L-<sup>35</sup>S-metionin terelusi dalam fraksi nomor 7. Selain itu diperoleh bahwa asam amino bertanda S-35 hasil biosintesis ini mempunyai kemurnian radiokimia yang tinggi (≈ 100 %) dan konsentrasi radioaktif dari L-<sup>35</sup>S-metionin sebesar 28 mCi/ml. Kelanjutan penelitian ini diharapkan hasilnya dapat digunakan sebagai bahan perunut dalam riset di bidang biologi molekular yang berguna dalam perkembangan bioteknologi di Indonesia.

**Kata kunci** : asam amino, biosintesis, sulfur-35, L-<sup>35</sup>S-metionin

#### ABSTRACT

The preliminary study of biosynthesis sulphur-35 amino acids labelled compounds has been done using wild strain of Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* as producer microorganism and the solution of Na<sup>35</sup>SO<sub>4</sub> (45 mCi/60 µL) as tracer source was added into the salt media, in which the incorporation of S-35 radioisotope to the yeast cells was synthesized.

Maximum incorporation of 93,5 % was obtained after 10 hours incubation at 30 °C. Hydrolysis was carried out using HCl 6N and heating at 110 °C for 18 hours to destroy the yeast cells, therefore L-35-methionine and the other amino acids would dissolve in the solution.

Hydrolysis isolation was exhibited using two step of column chromatographic using Dowex-exchanger resin as stationary phase and the demineralized steril water containing 0, 1 % β-mercapto ethanol (ME) and the mixing of water: HCl 4N which contains 0, 1% ME as mobile phase. The ratio volume of these both mobile phases were gradually adjusted. Purified amino acids were analyzed using paper chromatography method.

The result shows that the 7<sup>th</sup> fraction of eluate contained L-<sup>35</sup>S-methionine biosynthesized by yeast *Saccharomyces cerevisiae*, that had high radiochemical purity (100 %) and the radioactive concentration of L-<sup>35</sup>S-methionine was 28 mCi/ml.

**Key-words**: amino acids, biosynthesis, sulphur-35, L-<sup>35</sup>S-methionine.

## PENDAHULUAN

Radioisotop sulfur-35 ( $^{35}\text{S}$ ) adalah pemancar  $\beta$ -murni yang lemah mempunyai waktu paruh ( $T_{1/2}$ ) 87,4 hari dan energi maksimum ( $E_{\text{maks}}$ ) 167 keV yang ideal untuk digunakan sebagai perunut pada reaksi biologis. Dengan berkembangnya penelitian di bidang biologi molekular, maka penggunaan biomolekul bertanda radioisotop S-35 terutama L- $^{35}\text{S}$ -asam amino dan  $^{35}\text{S}$ -nukleotida menjadi semakin luas (Gajendiran dkk., 1994b).

Reaksi biologi molekular membutuhkan biomolekul bertanda radioisotop. Radioisotop yang biasa digunakan dan bertindak sebagai perunut adalah fosfor-32 ( $^{32}\text{P}$ ), sulfur-35 ( $^{35}\text{S}$ ), tritium-3 ( $^3\text{H}$ ) atau carbon-14 ( $^{14}\text{C}$ ). Senyawa bertanda yang dapat digunakan sebagai perunut harus mempunyai karakteristik yang ideal yaitu mempunyai kemurnian radiokimia, konsentrasi radioaktif dan aktivitas spesifik yang tinggi. Sebagai contoh untuk suatu reaksi translasi RNA secara *in vitro* membutuhkan senyawa bertanda L- $^{35}\text{S}$ -metionin dengan kemurnian radiokimia yang lebih besar dari 95 %, konsentrasi radioaktif minimum 10 mCi./ml. Karakteristik lain yang dibutuhkan oleh senyawa bertanda ini adalah aktivitas spesifik yang tinggi di atas 1200 mCi./mmol, dan mempunyai afinitas yang cukup besar dalam reaksi pembentukan protein (Promega, 1991).

Senyawa bertanda L- $^{35}\text{S}$ -metionin dapat dibuat secara kimiawi dengan metode yang konvensional. Hasil dari sintesis kimiawi ini akan diperoleh L- $^{35}\text{S}$ -metionin, D- $^{35}\text{S}$ -metionin dan campuran rasemat dari keduanya, sehingga diperlukan suatu proses pemisahan yang rumit dan menghasilkan senyawa yang kurang murni (Pine dkk., 1988).

Seperti telah diketahui bahwa sel makhluk hidup sebagian besar terdiri dari protein, dan hanya 20 asam amino penting saja yang terlibat dalam proses penyusunan protein, dua diantaranya ialah L-metionin dan L-sistein. Telah dipahami bersama bahwa makhluk hidup akan mempertahankan kehidupannya dengan mesintesis protein yang dibutuhkan oleh sel tubuhnya dengan mengambil unsur atau zat lain yang dibutuhkan dari lingkungannya. Selain itu telah dibuktikan pula bahwa asam amino yang terbentuk secara biologis oleh sel ragi hanya dalam bentuk L-asam amino dan tidak dalam bentuk D-asam amino (Lehninger, 1994).

Berdasarkan hal tersebut di atas maka senyawa L- $^{35}\text{S}$ -metionin dan L- $^{35}\text{S}$ -sistein dapat disintesis secara biologis, dengan menumbuhkan sel ragi *Saccharomyces cerevisiae* pada waktu tertentu di dalam media khusus yang bebas asam amino tetapi mengandung zat radioaktif sulfur-35 yang sengaja ditambahkan ke dalam media tersebut. Penelitian ini untuk mengetahui kemampuan biosintesis L- $^{35}\text{S}$ -metionin oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan adanya penambahan senyawa isotop Na- $^{35}\text{SO}_4$ .

Di dalam makalah ini dijelaskan suatu cara biosintesis asam amino L-metionin bertanda S-35 dari ragi *Saccharomyces cerevisiae* strain liar (*wild strain*) yang dilanjutkan dengan cara isolasi dan pemurniannya.

## METODOLOGI

### Bahan

Bahan yang digunakan adalah air steril bebas mineral, ragi *Saccharomyces cerevisiae: a wild type diploid strain of Baker's yeast* (Yeast Genetic Stock Centre Berkeley, USA) ; media YEPD (Yeast extract, peptone and dextrose medium); dan media garam) serta larutan Na $_2^{35}\text{SO}_4$  buatan Amersham. L-metionin, L-sistein, L-metionin-sulfoksida buatan Aldrich. NaOH, asam klorida, NH $_4\text{OH}$ , Dowex 50x12 (200-400 mesh), Dowex 50x8 (50-100 mesh),  $\beta$ -merkaptto etanol, propilen glikol dan pirogalol semuanya buatan E.Merck.

Bahan lain adalah gas nitrogen, kertas Whatman 1 dan larutan *cocktails* yang dalam satu literanya mengandung 385 ml dioksan, 385 ml toluen, 230 ml metanol, 5 g PPO (2,5-difenil oksazol), 100 mg dimetil-POPOP (C $_{26}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ ) dan 80 mg naftalen.

### Alat

**Peralatan** utama yang digunakan adalah boks aliran udara laminar (LAF), penangas air, kolom kromatografi yang dilengkapi dengan *water jacket*, pompa peristaltik, pengocok, probe alat cacah  $\beta$  (*Geiger-*

*Muller-probe*), rekorder, seperangkat alat kromatografi kertas, seperangkat alat otoradiografi, blok pemanas, alat pencacah sintilasi cair dan spektrofotometer (Hitachi 202).

### Cara Kerja

#### Persiapan sel ragi *Saccharomyces cerevisiae*

Ragi *S.cerevisiae* dibiakkan dalam media YEPD dan perbenihan ini disimpan pada temperatur 4 °C sebagai bahan persediaan. Hasil perbenihan ini selanjutnya ditumbuhkan dalam media YEPD cair. Setelah ragi tumbuh diambil sebanyak 40 µl campuran tersebut, kemudian disentrifugasi, dan supernatannya dipisahkan. Sel ragi yang tertinggal dicuci 2 atau 3 kali dengan 100 µl media garam (satu liter media ini mengandung 10 g glukosa, 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>, 1 g garam trinitrium sitrat, 2,5 g asparagin monohidrat, 375 mg KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>, 125 mg K<sub>2</sub>BPO<sub>4</sub>, 100 mg NaCl, 100 mg MgCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,4 mg seng asetat, 0,15 mg FeCl<sub>3</sub>, 0,025 mg CuCl<sub>2</sub>, 0,01 mg biotin, 0,5 mg Ca-pantotenat, 0,6 mg tiamin HCl, 1 mg piridoksin dan 10 mg inositol), (Gajendiran dkk., 1994a) dengan cara sentrifugasi, dan kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml media yang sama dan diinkubasi selama 24 jam pada 30 °C. Dengan metode pengenceran diatur sehingga diperoleh suatu sediaan yang mengandung ragi sebanyak 5 x 10<sup>6</sup> sel/ml.

#### Inkorporasi sulfur-35 ke dalam sel ragi

Sebagai sumber radioaktif S-35 adalah larutan Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> dengan konsentrasi radioaktif sebesar 750 mCi./ml dengan aktivitas jenis 1200 Ci./mmol. Sebanyak 45 mCi./60 µl larutan Na<sub>2</sub><sup>35</sup>SO<sub>4</sub> ditambahkan ke dalam perbenihan ragi yang mengandung 5 x 10<sup>6</sup> sel/ml, dan kemudian diinkubasi pada 30 °C sampai dengan 27 jam. Pada waktu tertentu yaitu 5, 10, 23 dan 27 jam dari perbenihan tersebut diambil cuplikannya sebanyak 5-10 µl untuk ditentukan besar inkorporasinya. Campuran kemudian disentrifugasi, sehingga sel ragi dan supernatannya dapat dipisahkan, sebanyak 5-10 µl media asal dan supernatan dicacah dengan alat pencacah sintilasi cair *Geiger Muller*, yang sebelumnya ditambah 10 ml larutan *cocktails*.

Besarnya inkorporasi S-35 di dalam sel ragi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inkorporasi} = \frac{\text{Cacahan media asal} - \text{Cacahan supernatan}}{\text{Cacahan media asal}} \times 100 \%$$

(Gajendiran dkk., 1994a)

#### Hidrolisis sel ragi *S.cerevisiae*

Ke dalam tabung gelas kecil tertutup rapat yang berisi sel ragi *S.cerevisiae* yang telah diinkorporasikan dengan radioisotop S-35, ditambah 1-2 ml HCl 6 N, kemudian dipanaskan pada temperatur 110 °C selama 18 jam menggunakan blok pemanas (*heating block*). Sebelum pemanasan, tabung gelas yang berisi sel ragi divakumkan dahulu, untuk menghilangkan udara yang mengandung oksigen dari dalam tabung.

Setelah hidrolisis selesai, hasilnya diuapkan dengan pompa vakum pada temperatur 30 °C sampai kering. Hidrolisat sel ragi setelah kering ditambah 2 - 3 ml air steril bebas mineral yang mengandung 0,1 % β-merkaptto etanol (air-ME), kemudian diuapkan kembali. Perlakuan ini diulang 3 - 4 kali untuk mengurangi kadar HCl yang berada dalam hidrolisat. Akhirnya hidrolisat yang telah kering ditambahi 1 ml air-ME, kemudian dimasukkan ke dalam labu tertutup rapat yang sebelumnya dialiri dengan gas nitrogen, kemudian disimpan pada temperatur -30 °C, yang selanjutnya dilakukan isolasi dan pemurnian untuk mendapatkan senyawa bertanda L-<sup>35</sup>S-metionin yang murni.

#### Isolasi senyawa bertanda L-<sup>35</sup>S-metionin dari hidrolisat ragi

Isolasi senyawa bertanda ini dilakukan melalui dua tahap kromatografi kolom.

##### Tahap pertama :

Kromatografi kolom ukuran 35 x 0,5 cm disiapkan dengan Dowex (H<sup>+</sup>) 50 x 12 (200-400 mesh) yang sudah diaktivasi dan dicuci dengan air-ME. Sebelum dan selama dilakukan kromatografi, kolom selalu dialiri gas N<sub>2</sub> dan didinginkan dengan aliran air yang bertemperatur 15-20 °C (*water jacket*).

Setelah pengaliran N<sub>2</sub> berlangsung selama 30 menit, kemudian hidrolisat diteteskan ke dalam kolom dengan hati-hati dan wadah penyimpanan dibilas dengan sesedikit mungkin air-ME. Kemudian kolom dielusi

dengan pelarut air -ME sambil selalu dialiri gas N<sub>2</sub>. Eluat yang diperoleh dari tahap pertama ini langsung dialirkan ke dalam kolom kromatografi tahap kedua.

*Tahap kedua :*

Pada kromatografi tahap kedua ini digunakan bahan penjerap Dowex(H<sup>+</sup>) 50 x 8 (50-100 mesh) dengan ukuran 4-5 x 0,5 cm. Seperti halnya pada tahap pertama, pada tahap ini pun kolom harus dilindungi dari panas dan oksigen. Elusi terdiri dari dua tahap yaitu: pertama menggunakan air-ME dan yang kedua campuran air dengan HCl 4N yang juga mengandung 0,1 % β-merkaptto etanol (HCl 4N-ME). Kedua pelarut ini dicampurkan secara berangsur-angsur (*gradient*) dari perbandingan air-ME : HCl 4N-ME = 100 : 0 sampai dengan 0 : 100 dengan bantuan pompa peristaltik dan alat pengaduk, sehingga kehomogenan pencampuran kedua pelarut tersebut terjamin. Kecepatan aliran pelarut diatur 30 ml/jam.

Larutan hasil elusi dari kromatografi tahap pertama, langsung dialirkan ke dalam kolom tahap kedua. Pertama-tama dielusi dengan air-ME, yang dimaksudkan untuk mempercepat aliran senyawa bertanda tersebut dalam kolom, sehingga masing-masing asam amino bertanda akan terikat pada bahan penjerap Dowex (H<sup>+</sup>) 50x8 (50-100 mesh) setelah itu dengan campuran air-ME : HCl 4 N-ME, sampai masing-masing pelarut yang terpakai mencapai 200 ml.

Selama elusi, radioaktivitas eluat yang keluar dari kolom terus dipantau menggunakan detektor Geiger-Muller yang tersambung dengan alat rekorder pencatat besarnya radioaktivitas tersebut pada kertas. Masing-masing fraksi sebanyak 25 ml ditampung sambil didinginkan. Fraksi-fraksi yang mengandung L-<sup>35</sup>S-metionin, L-<sup>35</sup>S- sistein dan zat pengotor lainnya akan terpisah, selanjutnya dilakukan analisis kemurniannya.

***Analisis L-<sup>35</sup>S-Medionin***

Analisis hasil sintesis dilakukan dengan cara kromatografi kertas. Tiap fraksi dari eluat dimulai dari fraksi nomor 4 sampai dengan nomor 8 ditotolkan pada kertas kromatografi Whatman 1 (20 x 80 cm). Fase gerak yang digunakan adalah campuran dari n-butanol : etanol : air = 2 : 2 : 1 yang mengandung 0,1 % β-ME (100 ml pelarut ditambahi 100 µL β-merkaptto etanol).

Pada saat penotolan cuplikan dan selama kromatografi diusahakan tetap berada di bawah aliran gas N<sub>2</sub> untuk menghindari terjadinya oksidasi dari L-metionin. Sebagai zat pembanding digunakan L-metionin, L-metionin sulfoksida, dan L-sistein, yang semuanya dilarutkan dalam air-ME- dengan konsentrasi 10 mg/ml.

Setelah dielusi selama 15 jam, kertas diangkat dan dikeringkan, kemudian disemprot dengan larutan 2% ninhidrin/ aseton sebagai bahan penampak noda, sehingga R<sub>f</sub> dari masing-masing zat pembanding dapat diketahui. Selanjutnya dilakukan otoradiografi selama 2-3 hari, dan noda dari L-metionin dan L-sistein bertanda S-35 dapat dilihat dan ditentukan R<sub>f</sub>-nya sambil dibandingkan dengan R<sub>f</sub> dari zat pembanding.

***Pemurnian L-<sup>35</sup>S-Metionin***

Tahap selanjutnya adalah pemurnian L-<sup>35</sup>S-metionin dari sisa asam klorida yang masih terdapat dalam larutan.

Untuk ini diperlukan kromatografi kolom ketiga dengan spesifikasi yang sama dengan kolom tahap dua. Kolom sebelum digunakan dicuci bersih dengan air-NE sampai netral terhadap kertas lakmus.

Larutan <sup>35</sup>S-metionin dimasukkan ke dalam kolom, kemudian dielusi dengan larutan NH<sub>4</sub>OH 2N yang mengandung 0, 1 % ME dan eluat ditampung masing-masing sebanyak 25 ml sambil direndam dalam es dan dialiri N<sub>2</sub>.

Fraksi yang mengandung L-<sup>35</sup>S-metionin ditotolkan pada kertas kromatografi dan dibandingkan dengan L-metionin non radioaktif. Pada saat penotolan L-<sup>35</sup>S-metionin di atas kertas kromatografi ditambahi 1 µl larutan L-metionin non-radioaktif sebagai pembawa dengan menggunakan pipa kapiler. Selanjutnya kromatografi dielusi dengan pelarut yang sama dengan yang digunakan pada kromatografi sebelumnya. Penampakan noda dilakukan dengan larutan ninhidrin yang dilanjutkan dengan pemantauan adanya radioaktivitas dengan *GM-detektor*.

***Penyimpanan L-<sup>35</sup>S-metionin***

Fraksi eluat yang mengandung senyawa L-<sup>35</sup>S-metionin dan L-<sup>35</sup>S-sistein, masing-masing dimasukkan ke dalam labu alas bulat ukuran 50 ml atau yang sesuai, kemudian diupkan dengan alat

evaporator sampai kering sambil dialiri gas nitrogen, kemudian ditambah 1 ml air-ME dan konsentrasi radioaktif dari masing-masing larutan diukur.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Seperti diketahui bahwa penyusun protein di dalam jasad hidup terdiri atas 20 macam asam amino yang penting dan dua di antaranya mengandung unsur sulfur (S) di dalam stuktur molekulnya. Karena itu, pada saat dilakukan penambahan radoisotop sulfur-35 ke dalam media, maka radioisotop ini hanya ditangkap (*up take*) oleh dua macam asam amino yaitu metionin dan sistein. Selain itu telah terbukti bahwa dalam ragi *S.cerevisiae* hanya akan tersintesis asam amino dalam bentuk L-metionin dan L-sistein, berbeda halnya apabila disintesis secara kimiawi di mana akan terbentuk dua macam yaitu bentuk D dan L atau campuran dari keduanya (Gajendiran dkk.,1994a; Lehninger, 1994).

Penetapan jumlah sel ragi *S.cerevisiae* di dalam perbenihan menggunakan metode pengenceran yang biasa dilakukan untuk perhitungan jumlah leukosit (sel darah putih).

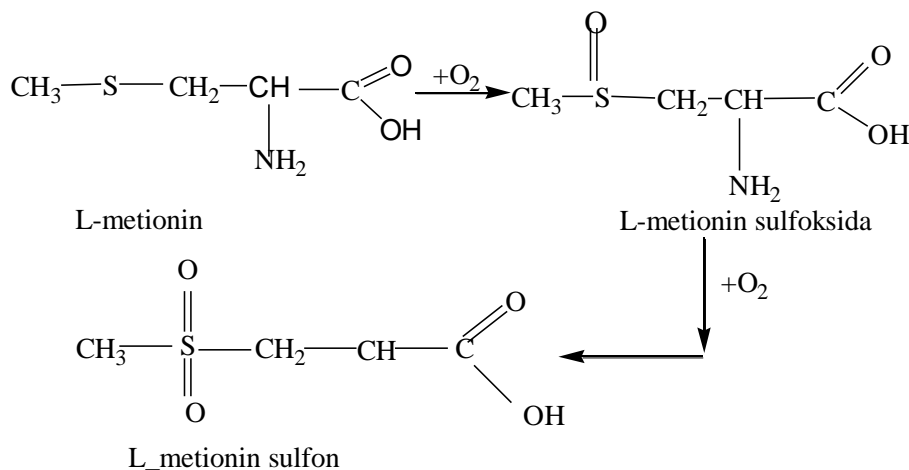
Besarnya inkorporasi sulfur-35 dalam sel ragi yang tertinggi diperoleh setelah diinkubasi selama 10 jam, yaitu sebesar 93,5 %. Waktu 10 jam ini merupakan waktu yang optimum, karena bila diinkubasi lebih dari 10 jam ( Tabel 1 ) besarnya persen inkorporasi akan turun. Hal ini disebabkan karena banyaknya sel ragi yang mati akibat radiolisis (Gajendiran dkk, 1994b).

Tabel I. Pengaruh waktu inkubasi terhadap besarnya inkorporasi S-35 pada sel ragi

No.	Waktu inkubasi	% inkorporasi S-35 pada sel ragi
1.	5 jam 30 menit	16,4
2.	10 jam	93,5
3.	23 jam	34,4
4.	27 jam	31,8

Pada Tabel I terlihat bahwa inkubasi 23 jam menyebabkan terjadinya kenaikan radioaktivitas dalam supernatan. Hal ini disebabkan karena banyaknya asam amino yang dilepaskan ke dalam larutan yang berasal dari hasil metabolisme dan dari sel ragi yang mati.

Dalam penelitian ini digunakan air steril bebas mineral dan mengandung 0,1 % β-merkaptto etanol (ME) untuk mencegah terjadinya oksidasi L-metionin menjadi L-metionin-sulfoksida dan L-metionin-sulfon oleh oksigen udara. Oleh sebab itu seluruh proses pekerjaan ini dilakukan dalam keadaan dingin (18-20 °C) dan dialiri gas N<sub>2</sub> yang bebas oksigen.



Gambar 1. Pengaruh oksigen terhadap molekul metionin

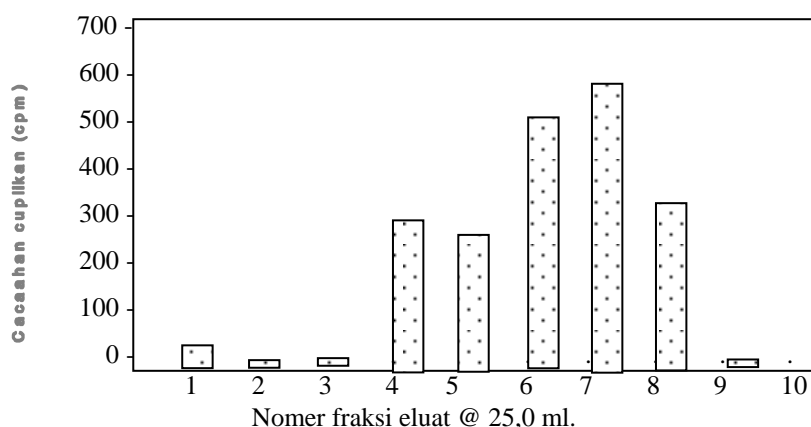
Isolasi senyawa bertanda L-<sup>35</sup>S-metionin dilakukan melalui dua tahap kromatografi kolom dengan bahan penjerap Dowex sebagai resin penukar kation. Tahap pertama, digunakan Dowex 50x12 (H<sup>+</sup>) (200-400 mesh) dengan ukuran kolom 35 x 0,5 cm. Tahap ini dilakukan untuk menjerap sisa dinding sel ragi yang berada dalam hidrolisat, sedangkan asam amino akan terbawa oleh pelarut (air-ME) dan melewati kolom kromatografi tahap kedua.

Kromatografi tahap kedua dimaksudkan untuk memisahkan masing-masing asam amino terutama L-<sup>35</sup>S-metionin, L-<sup>35</sup>S-sistein dan senyawa lain sebagai pengotor radiokimia seperti L-<sup>35</sup>S-metionin sulfoksida atau L-<sup>35</sup>S-metionin sulfon. Pada tahap ini sebagai penjerap digunakan Dowex 50 x 8 (H<sup>+</sup>) dengan ukuran partikel yang lebih besar (50-100 mesh). Pelarut digunakan dua macam, yang pertama air-ME dan yang kedua larutan air dengan HCl 4N yang dicampur secara *gradient*. Dengan pelarut yang demikian, pH pelarut ini dapat diubah secara berangsur-angsur. Seperti telah diketahui bahwa asam amino mempunyai sifat yang unik, secara umum mereka mempunyai sifat yang mirip, yaitu mempunyai gugus amina yang memberikan sifat basa, dan mempunyai gugus karboksil yang memberikan sifat asam. Tetapi sifat amfoter (sifat asam-basa) dari tiap asam amino berbeda terutama pada nilai pKa dan titik iso-elektriknya (*pHI*) [5]. Perbedaan dari nilai pKa dan titik isoelektrik dari asam amino inilah yang digunakan sebagai dasar pemisahan pada kromatografi tahap kedua ini (Wirahadikusuma 1989). Pada saat eluat dari kromatografi tahap pertama dilewatkan dengan bantuan pelarut air-ME ke dalam kolom kedua, L-<sup>35</sup>S-metionin dan asam amino lain (pengotornya) akan terikat pada resin penukar kation tersebut. Kemudian pada saat pelarut air-HCl 4N (ME) dengan pH berubah-ubah dilewatkan, masing-masing asam amino akan terlepas kembali dari resin pada pH yang berlainan. Sehingga L-<sup>35</sup>S-metionin dapat dipisahkan secara sempurna dari pengotor asam amino lainnya.

Saat melakukan percobaan, kadang-kadang besarnya radioaktivitas dari tiap fraksi yang dicatat oleh detektor GM tidak terlihat jelas. Pada keadaan demikian, pengukuran aktivitas dilakukan terhadap cuplikan yang diambil dari tiap fraksi sebanyak 100-200 µl, kemudian ditambah 10 ml larutan *cocktails* dan dicacah dengan alat sintilasi cair hasilnya dapat dilihat pada Gambar 2.

Dari hasil pencacahan cuplikan diketahui bahwa kromatografi kolom tahap 2 menghasilkan beberapa fraksi yang mengandung radioaktivitas yaitu fraksi nomor 1, 4, 5, 6, 7 dan 8.

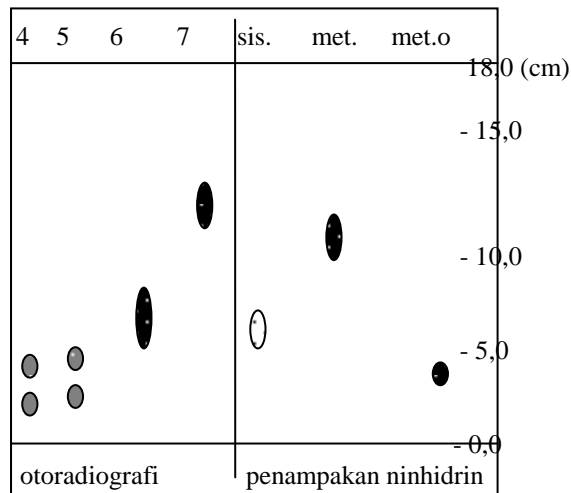
Fraksi 7 dan 8 dicampurkan, sedangkan fraksi 1,2 dan 3 dipisahkan karena di dalam fraksi ini terkandung senyawa <sup>35</sup>SO<sub>4</sub>-bebas dan pengotor radiokimia lainnya yang berbobot molekul kecil. Gambar 3 menunjukkan hasil kromatografi dari masing-masing fraksi 4, 5, 6 dan campuran 7 dan 8 yang dibandingkan dengan senyawa pembanding L-metionin, L-metionin sulfoksida, dan L-sistein non-radioaktif.



Gambar 2. Hasil fraksinasi dari kromatografi tahap 2 (Dowex 50 x 8 H<sup>+</sup>).

Noda dari fraksi 4, 5, 6 dan 7 ditentukan dengan otoradiografi, sedangkan noda dari senyawa pembanding non-radioaktif ditampakkan dengan larutan 2 % ninhidrin/aseton.

Gambar 3 menunjukkan beberapa noda yang terpisah dengan baik. Fraksi 4 dan 5 masing-masing memberikan dua buah noda dengan nilai Rf yang berbeda. Noda yang pertama dengan Rf = 0,23-0,24, sedangkan noda kedua mempunyai Rf = 0,34-0,38. Fraksi 6 memberikan noda dengan Rf yang sama dengan Rf L-sistein pembanding yang ditunjukkan dengan noda berwarna ungu setelah disemprot dengan larutan ninhidrin yaitu 0,38. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa fraksi 4 dan 5, mengandung campuran dari senyawa L-<sup>35</sup>S-metionin sulfoksida (met-o) dan sedikit senyawa L-<sup>35</sup>S-sistein (sis). Sedangkan fraksi 6 mengandung senyawa L-<sup>35</sup>S-sistein yang lebih murni dari pada yang berada dalam fraksi 5, yang ditunjukkan dengan adanya satu noda pada otoradiografi.

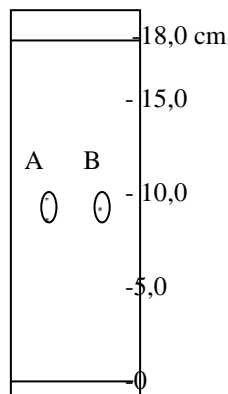


Gambar 3. Kromatogram cuplikan masing-masing fraksi kromatografi yang ditampakan dengan otoradiografi dan semprotan larutan ninhidrin. (angka 4,5,6 dan 7 menunjukkan nomor fraksi kromatografi)

Fraksi 7 memberikan noda dengan Rf = 0,67 di mana nilai ini lebih besar bila dibandingkan dengan nilai Rf L-metionin (met) pembanding yang hanya 0,54. Hal ini disebabkan karena L-<sup>35</sup>S-metionin hasil sintesis masih berada dalam larutan yang mengandung HCl dari sisa bahan pengelusi sehingga memberikan nilai Rf yang lebih tinggi dari pada L-metionin pembanding yang dilarutkan dalam air. Dalam struktur molekul L-metionin terdapat satu pasang elektron sunyi sehingga sangat mudah menangkap ion yang bermuatan positif (H<sup>+</sup>) dari HCl dan menyebabkan perbedaan Rf dengan L-metionin standar. Berbeda halnya dengan molekul L-sistein, walaupun berada dalam lingkungan HCl mempunyai Rf yang sama dengan zat pembanding (Gambar 3). Setelah kandungan HCl-nya dihilangkan dengan cara melewati sediaan tersebut ke dalam kolom kromatografi ke-3 yang dielusi dengan larutan NH<sub>4</sub>OH 2N, kemudian eluat dianalisis kembali menggunakan kromatografi kertas, ternyata memberikan noda dengan Rf yang sama dengan standar L-metionin, seperti terlihat pada Gambar 4.

Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa bertanda L-<sup>35</sup>S-metionin terelusi pada fraksi nomor 7, sedangkan L-<sup>35</sup>S-sistein pada fraksi nomor 6.

Kandungan HCl dari masing-masing sediaan tersebut diuapkan sampai kering, kemudian dilarutkan kembali dalam sejumlah volume air-ME sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Setelah besarnya radioaktivitas diukur, diperoleh bahwa sediaan L-<sup>35</sup>S-metionin mempunyai konsentrasi radioaktivitas sebesar 28 mCi/ml, selanjutnya sediaan ini disimpan di bawah lingkungan N<sub>2</sub> pada temperatur -30 °C.



A = Noda  $^{35}\text{S}$ -L-metionin yang ditentukan dengan GM-counter  
B = Noda L-metionin non radioaktif yang ditampakan dengan ninhidrin

Gambar 4. Kromatogram L- $^{35}\text{S}$ -metionin murni hasil biosintesis, dibandingkan dengan L-metionin non-radioaktif.

### KESIMPULAN

Senyawa bertanda L- $^{35}\text{S}$ -metionin dapat dibiosintesis oleh *Saccharomyces cerevisiae* dengan menggunakan media garam yang ditambah larutan radioaktif  $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ , diinkubasi selama 10 jam pada temperatur 30 °C.

Hidrolisis sel ragi dilakukan dengan HCl 6N yang dipanaskan pada 110 °C selama 18 jam. Isolasi kedua senyawa bertanda tersebut dilakukan melalui dua tahap kromatografi kolom dengan bahan penyerap Dowex ( $\text{H}^+$ ) 50 x 8 (50-100 mesh), yang memberikan hasil bahwa senyawa bertanda L- $^{35}\text{S}$ -metionin terelusi pada fraksi nomor 7 dan sedikit pada nomor 8.

Dari hasil analisis diperoleh bahwa L- $^{35}\text{S}$ -metionin hasil biosintesis ini mempunyai kemurnian radiokimia yang tinggi (~100 %), dan konsentrasi radioaktif dari L- $^{35}\text{S}$ -metionin sebesar 28 mCi/ml. Bila dilihat dari tingginya kemurnian radiokimia dan besarnya konsentrasi radioaktif yang diperoleh dari asam amino L- $^{35}\text{S}$ -metionin yang dihasilkan, memberikan harapan bahwa senyawa bertanda ini dapat dipergunakan untuk penelitian selanjutnya.

Setelah kedua hal tersebut dapat ditentukan, diharapkan asam amino bertanda L- $^{35}\text{S}$ -metionin dapat digunakan sebagai bahan perunut untuk memenuhi kebutuhan penelitian di bidang biologi molekular dan memberikan andil yang positif bagi perkembangan bioteknologi di Indonesia.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Mr. N. Jayachandran dari BRIT, Vashi-Bombay, India yang telah memberikan saran dan petunjuknya dalam menyelesaikan penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Gajendiran, N., Jayachandran, N., Rao, B.S., Unny, V.K.P., Thyagarajan, S., 1994a, Biotechnological Production of High Specific Activity L- $^{35}\text{S}$ -systeine and L- $^{35}\text{S}$ -methionine by Using Diploid Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, XXXIV, 6, 571-576.
- Gajendiran, N., Rao, B.S., Anjaria, K.S., Unny, V.K.P., and Thyagarajan, S., 1994b, Radiotoxicity of sulfur-35, *Technical Report in LCO/BRIT*, Bombay, India.
- Lehninger, A.L., 1994, *Principal of Biochemistry*, Edisi Indonesia, Penerbit Erlangga, Jakarta, Cetakan pertama, 114-115, 121-123.



- Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J. and Hammond, G.S., 1988, *Organic Chemistry*, Edisi Indonesia, Penerbit ITB, Bandung, 865-876.
- Promega, 1991, *Protocols and Application Guide*, Biological Research Products, Promega Corporation, 2<sup>nd</sup> ed, USA, 155-158
- Wirahadikusumah, M., 1989, *Biokimia*, Penerbit ITB, Bandung, 5-6,75.