

MAKALAH PENDAMPING : PARALEL E



SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA IV
"Peran Riset dan Pembelajaran Kimia dalam Peningkatan Kompetensi
Profesional"
Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS
Surakarta, 31 Maret 2012



PEMBUATAN DAN PEMURNIAN SENYAWA NUKLEOTIDA BERTANDA [γ - 32 P]ATP

**Wira Y Rahman^{1*}, Endang Sarmini, Herlina, Triyanto, Hambali,
Abdul Mutalib, Santi Nurbaiti²**

¹ Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR) - BATAN
Gd.11 Kawasan PUSPIPTEK Serpong Tangerang 15313

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

² Kelompok Keahlian Kimia ITB

ABSTRAK

Pembuatan dan Pemurnian Senyawa Nukleotida Bertanda [γ - 32 P]ATP. Dalam perkembangan biologi molekuler, 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 nukleotida bertanda fosfor-32 (32 P) [γ - 32 P]-adenosine triphosphate {[γ - 32 P]-ATP} yang banyak digunakan dalam penelitian biologi molekuler. Untuk dapat menunjang penelitian biologi molekuler di Indonesia, pada penelitian ini telah dilakukan pembuatan senyawa nukleotida bertanda [γ - 32 P]-ATP melalui serangkaian reaksi enzimatik yang merupakan bagian dari proses glikolisis dengan prekursor fruktosa 1,6-diphosphat, nukleotida adenosine diphosphate (ADP) dan $H_3^{32}PO_4$, menggunakan enzim aldolase, gliseraldehid 3-phosphat dehidrogenase, 3-phosphogliserat-kinase dan laktat dehidrogenase. Pemurnian [γ - 32 P]-ATP hasil sintesis dilakukan berdasarkan metoda pemisahan dari Schendel dan Wells, dengan menggunakan kolom kromatografi DEAE-*Sephadex*. Dari proses sintesis dan pemurnian yang telah dilakukan berhasil diperoleh [γ - 32 P]-ATP dengan aktifitas 103,5 μ Ci dan kemurnian radiokimia 96,74%. Dengan berhasilnya dilakukan sintesis dan pemurnian [γ - 32 P]-ATP, maka Pusat Radioisotop dan Radiofarmaka akan dapat menyediakan nukleotida bertanda dimaksud di atas atau nukleotida bertanda lainnya untuk menunjang penelitian biologi molekuler di Indonesia.

Kata Kunci: nukleotida bertanda [γ - 32 P]ATP, sintesis, reaksi enzimatik, pemurnian

PENDAHULUAN

Pemanfaatan teknologi nuklir untuk kesejahteraan manusia telah merambah ber-bagaibidang 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 radio-isotop telah berkembang dengan cepat, tidak hanya digunakan dalam pencitraan untuk memperoleh informasi fungsional suatu senyawa, melainkan juga untuk men-dalami berbagai proses fisiologi dan patologi.^[1,2,3]

Salah satu aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan yang dikombinasi dengan teknik biologi molekuler adalah

deteksi human papilloma virus (HPV) penyebab kanker serviks. 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 [γ - 32 P]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].

Pelacak DNA/RNA yang digunakan untuk mendeteksi gen atau fragmen DNA yang diinginkan atau untuk mendeteksi klon yang benar [1,2,4,6]. Pendeteksian dilakukan dengan memisahkan sampel DNA utas ganda menjadi utas tunggal dan mentransferkannya ke membran nilon. Saat diinkubasi dengan membran dalam larutan, pelacak mengikat bagian-bagian yang merupakan pasangannya dalam DNA dan "melekat" pada membran. Setelah itu, dilakukan kontak antara membran dengan selebar film fotografis yang sensitif terhadap emisi radioaktif. Hanya bagian-bagian dari sampel tempat lokasi gen yang terlihat sebagai titik gelap pada film, karena hanya bagian itulah yang terikat pada pelacak radioaktif.

Seiring dengan perkembangan biologi molekuler di Indonesia maka kebutuhan akan senyawa nukleotida bertanda untuk perunut menjadi sangat penting. Untuk itu penguasaan teknik sintesa nukleotida bertanda akan sangat mendukung peningkatan kemampuan di bidang biologi molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk membuat senyawa nukleotida bertanda [γ - ^{32}P]ATP yang akan digunakan untuk penelitian dalam bidang biologi molekuler. Sintesa [γ - ^{32}P]ATP dalam penelitian ini dilakukan berdasarkan metoda yang dikembangkan oleh Sakamoto^[10] yang kemudian diikuti dengan pemurnian dengan menggunakan penukar anion DEAE-Sephadex.

TATA KERJA

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ bebas pengemban dengan kemurnian radiokimia diatas 97% yang diperoleh dari proses pemurnian $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang dihasilkan oleh PTNBR BATAN, Bandung. Enzim aldolase (9 unit/mg) 10 mg/ml, gliseraldehid-3-phosphat dehidrogenase (80 unit/mg) 10 mg/ml, phosphogliserat kinase (450 unit/mg) 10 mg/ml, fruktosa-1,6-disfosfat, sodium piruvat, dithiothreitol, tris-HCl, etilendiamintetraasetat (EDTA), fructose 1,6-bisphosphate dari Sigma Aldrich. Sedangkan laktat dehidrogenase (250 unit/mg) 5 mg/ml, adenosin difosfat (ADP), β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), magnesium klorida dari Merck.

Bahan penunjang yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu kolom kromatografi *DowexAG 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 (Mempert), Mini TLC Scanner (Bioscan AR-2000), dan *Liquid Scintillation Counter* (LSC) (MicroBeta Trilux).

Cara kerja

1. Preparasi campuran yang digunakan pembuatan larutan campuran A (Tabel 1).
2. Preparasi pereaksi campuran untuk buffer pelet enzim. Pembuatan larutan campuran B (Tabel 2).
3. Preparasi campuran enzim (Tabel 3)
Campuran enzim tersebut disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama 20 menit. Setelah diambil supernatannya, endapan enzim kemudian dilarutkan dengan 10 μL campuran B.
4. Proses pembuatan [γ - ^{32}P]ATP
Ke dalam tabung mikro bervolume 1,5 mL dimasukkan 40 μL $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (aktivitas terukur) pH diatur menjadi 7-9 dengan penambahan larutan 5M NaOH. Selanjutnya ke dalam larutan tersebut ditambahkan berturut-turut 40 μL larutan campuran A dan 10 μL campuran enzim. Campuran reaksi kemudian diinkubasi selama (t) menit dan dicuplik setiap waktu tertentu selama 1 jam. Reaksi enzimatik kemudian dihentikan dengan memasukkan tabung mikro ke dalam penangas air bersuhu 70°C selama 3 menit. [γ - ^{32}P]ATP yang terbentuk kemudian dimurnikan dengan menggunakan kolom penukar ion DEAE-Sephadex.
5. Proses pemisahan hasil sintesa [γ - ^{32}P]ATP
[γ - ^{32}P]ATP hasil sintesa dimurnikan/dipisahkan dengan menggunakan kolom DEAE-Sephadex berpendingin (4°C) yang telah dikondisikan dengan HCl 0,03 M. Pemurnian [γ - ^{32}P]ATP dilakukan dengan menggunakan dua eluen berbeda yaitu HCl dan NH_4HCO_3 .
Cara pertama, kolom dielusi dengan 20 mL HCl 0,03 M untuk menghilangkan fosfat anorganik, AMP, ADP dan ATP yang tidak tertandai. Untuk mendapatkan [γ - ^{32}P]ATP, kolom selanjutnya dielusi dengan HCl 0,3 M (30 fraksi, 0,5 mL/fraksi). Aktivitas masing-masing fraksi diukur, selanjutnya dibuat grafik antara aktivitas terhadap nomor fraksi.

Puncak ATP ditentukan dengan LSC dan KLT *PEI Cellulose*.

Cara kedua, kolom dielusi dengan 16 mL NH_4HCO_3 0,01 M (fraksi 1-8, 2 mL/fraksi) untuk mengelusi enzim dari kolom. Kemudian kolom dielusi dengan 10 mL NH_4HCO_3 0,1 M (fraksi 9-13) untuk menghilangkan sisa ADP dan ATP yang tidak bereaksi. Kolom dielusi kembali dengan 16 mL NH_4HCO_3 0,23 M (fraksi 14 – 21) untuk menghilangkan P-32 yang tidak bereaksi. ATP yang telah ditandai P-32, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 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 KLT *PEI Cellulose*.

6. Pengujian/Karakterisasi hasil sintesa $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$

Hasil penandaan dikarakterisasi dengan KLT dengan menggunakan *PEI Cellulose* sebagai fasa diam dan larutan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa gerak yang kemudian ditentukan R_f -nya dengan *Bioscanner*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Proses sintesa nukleotida bertanda $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ menggunakan metoda yang dikembangkan oleh Sakamoto^[10] yaitu dengan memanfaatkan sebagian jalur glikolisis. Pembuatan senyawa nukleotida bertanda P-32 dilakukan secara enzimatik seperti terlihat pada Gambar 1. Reaksi diawali dari perubahan fruktosa-1,6-difosfat (6C) menjadi 3-difosfogliseraldehid (3C) dan dihidroksi-aseton-fosfat (3C) dengan bantuan enzim aldolase. Dihidroksi-aseton-fosfat kemudian diubah menjadi 3-fosfogliseraldehid dengan pertolongan enzim glyce-rol-3-phosphate dehydrogenase. Selanjutnya fosfogliseraldehid bereaksi dengan asam fosfat ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$) menghasilkan 1,3-difosfogliseraldehid. Senyawa 1,3-difosfo-gliseralehid berubah menjadi asam 1,3-difosfoglisarat dengan bantuan enzim gliseralehid-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 pengubahan asam piruvat menjadi asam laktat. Senyawa 1,3-difosfoglisarat selanjutnya berubah menjadi 3-fosfoglisarat dengan bantuan enzim fosfoglisarat kinase, disertai

dengan perubahan ADP menjadi ATP. Proses pemisahan dan pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dilakukandengan menggunakan kromatografi penukar anion DEAE-Sephadex^[5,10,11].

Oleh karena dalam proses penyiapan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 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 penandaan yang dimaksud di atas. Hal ini dilakukan karena radionuklida ^{32}P berupa larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (dalam bentuk ortofosfat) cenderung tidak stabil dalam penyimpanan dan mudah berubah menjadi senyawa polifosfat.

Hasil pemeriksaan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dengan sistem KLT, dengan menggunakan *PEI Cellulose* sebagai fasa diam dan larutan KH_2PO_4 0,5 M pH 3,5 sebagai fasa gerak, memperlihatkan adanya dua komponen dalam larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang diuji. Seperti terlihat pada Gambar 2, hanya ada 86,48% ^{32}P dalam bentuk $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ ($R_f = 0,7$) dalam larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang diuji.

Dalam proses sintesis $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ diperlukan radiokimia ^{32}P dengan kemurnian dalam bentuk $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4 > 97\%$. Kemurnian radiokimia ^{32}P dalam bentuk $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang $< 97\%$ dapat menghambat reaksi enzimatik yang akan dilakukan. Untuk mengatasi hal tersebut $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (kemurnian $< 97\%$) yang akan digunakan harus dimurnikan terlebih dahulu sehingga diperoleh larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dengan kemurnian radiokimia yang tinggi ($> 97\%$) dan layak digunakan untuk pembuatan nukleotida bertanda $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Pemurnian dilakukandengan melewati $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (kemurnian 86,48%) pada sebuah kolom penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) yang telah dikondisikan dengan HCl 1M. Fraksi-fraksi hasil elusi kemudian ditampung dan dianalisa dengan sistem KLT dengan menggunakan *PEI cellulose* sebagai fasa diam dan larutan KH_2PO_4 0,5M pH 3,5 sebagai fasa gerak. Radio-kromatogram $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang telah dimurnikan dengan kolom penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) dapat dilihat pada Gambar 3. Dari kromatogram ini dapat dilihat kemurnian ^{32}P dalam bentuk $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ meningkat secara signifikan menjadi 99,85%.

$\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ hasil pemurnian (kemurnian $> 99\%$) selanjutnya digunakan untuk proses sintesis $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ dengan cara menginkubasi sejumlah tertentu larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dengan prekursor-prekursor lainnya dengan keberadaan campuran enzim selama selang waktu tertentu. Pembentukan $[\gamma\text{-}$

^{32}P]ATP diamati/ dimonitor dengan cara mencuplik sejumlah tertentu sampel setelah (t) 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. Radiokromatogram cuplikan yang diambil 60 menit setelah proses inkubasi dapat dilihat pada Gambar 4. Dari kromatogram ini dapat dilihat per-sentase kelimpahan penandaan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP sebesar 33,46%, (R_f 0,241). Dari kromatogram yang sama juga dapat dilihat masih terdapat 65,90% $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ (R_f 0,608) bebas atau yang tidak terikat pada ATP.

Untuk mendapatkan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP dengan kemurnian radiokimia yang memenuhi persyaratan untuk dapat digunakan dalam aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan (kemurnian radiokimia > 95%), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP hasil sintesis kemudian dimurnikan dengan sistim kromatografi dengan menggunakan kolom kromatografi penukar anion DEAE-Sephadex yang telah dikembangkan dengan air selama 24 jam menggunakan *orbital shaker* dengan kecepatan 150 rpm, kemudian dikondisikan dengan HCl 0,03 M. Kolom pertama dielusi dengan 20 mL HCl 0,03 M untuk menghilangkan sisa-sisa fosfat anorganik, AMP, ADP dan ATP yang tidak terikat. Untuk mengelusi ATP bertanda P-32, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, yang terbentuk, kolom kemudian dielusi dengan 15 mL HCl 0,3 M (30 fraksi, 0,5 mL/ fraksi). Aktivitas setiap fraksi (15 fraksi) kemudian diukur dengan LSC. Pada Gambar 5 dapat dilihat profil elusi/ kromatogram pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

Untuk melihat kemurnian radiokimia $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP hasil pemisahan, setiap fraksi yang ditampung 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. Hasil radioanalisa ini menunjukkan adanya aktivitas nukleotida bertanda $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP pada fraksi 5, 6, 7 dan 8 dengan kemurnian radiokimia berturut-turut adalah 70,57, 78,44, 73,69 dan 76,53%. Gambar 6 memperlihatkan radiokromatogram $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP hasil pemurnian (fraksi 6) dengan kolom kromatografi penukar anion DEAE-Sephadex dengan menggunakan eluen HCl 0,03 M. Dari kromatogram ini dapat dilihat bahwa kemurnian radiokimia $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP hasil pemurnian hanya ~ 75% jauh dari kemurnian radiokimia yang diinginkan (>95%).

Untuk mendapatkan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP dengan kemurnian radiokimia > 95%, metoda pemurnian kemudian dimodifikasi

seperti proses pemisahan yang digunakan oleh Schendel dan Wells [1], yaitu 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 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 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 16 mL NH_4HCO_3 0,01 M untuk menghilangkan enzim, dengan 10 mL NH_4HCO_3 0,1 M untuk menghilangkan ADP dan ATP yang tidak bereaksi dan dengan 16 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 ditandai P-32, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP.

Gambar 7 memperlihatkan profil elusi pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 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 15, 16, 17 dan 18 merupakan P-32 bebas yang tidak bereaksi menjadi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ($R_f = 0,6$). Sementara itu fraksi 22, 23 dan 24 merupakan fraksi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP dengan kemurnian radiokimia > 95%. Gambar 8 memperlihatkan kromatogram salah satu fraksi yang dimaksud diatas (fraksi 23), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ($R_f = 0,2$), dengan kemurnian radiokimia > 95%.

Fraksi 22, 23 dan 24 kemudian dikumpulkan untuk mendapat $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ yang akan digunakan untuk aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan. Tetapi karena radioaktifitas yang didapatkan dari ketiga fraksi tersebut hanya 103,5 $\mu\text{Ci}/2\text{ml}$, untuk sementara waktu $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP dengan kemurnian radiokimia mencapai 96,74% ini belum dapat digunakan. Penelitian selanjutnya yang menggunakan NH_4HCO_3 dengan aktifitas yang lebih tinggi diharapkan dapat menyediakan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP dengan aktivitas yang lebih tinggi sehingga dapat digunakan untuk aplikasi teknologi nuklir dalam bidang kesehatan.

KESIMPULAN

Pemurnian larutan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ yang akan digunakan untuk pembuatan nukleotida bertanda ^{32}P , $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP, telah berhasil dilakukan. Pemurnian dilakukan dengan cara melewatkan $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ dengan kemurnian radiokimia 86,48% kedalam

kolom penukar kation Dowex AG 50 (1 x 8) yang telah dikondisikan dengan HCl 1M. Kemurnian radiokimia $H_3^{32}PO_4$ meningkat secara signifikan (> 99%) setelah proses pemurnian ini. Sementara itu rendemen sintesis $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dengan menggunakan metoda yang dilaporkan oleh Sakamoto adalah 33,46 %. Untuk mendapatkan $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ 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 dua eluen yang berbeda yaitu HCl dan NH_4HCO_3 . Proses pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dengan menggunakan eluen HCl hanya dapat memberikan $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dengan kemurnian radiokimia ~ 75%, jauh dari kemurnian radiokimia yang diharapkan (>95%). Sebaliknya pemurnian yang menggunakan NH_4HCO_3 sebagai eluen (metoda pemisahan dari Schendel dan Wells), berhasil memberikan $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dengan kemurnian radionuklida ~ 96,74%.

Dengan berhasilnya dilakukan proses pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dari *raw product* nya, sehingga membuka peluang proses pembuatan berkelanjutan untuk memproduksi nukleotida bertanda ^{32}P lainnya. Oleh sebab itu penelitian selanjutnya akan lebih ditekankan untuk mendapatkan $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ dengan aktivitas yang lebih tinggi dengan cara mengoptimasi lamanya waktu penandaan dan menggunakan $H_3^{32}PO_4$ dengan aktifitas yang tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada sejawat dari PTNBR – BATAN Bandung, terutama Ibu Azmairit dkk, atas kerjasamanya yang baik dalam penyediaan $P\text{-}32(H_3^{32}PO_4)$. Semoga hasil sintesa nukleotida bertanda P-32 yang dihasilkan nantinya jauh lebih baik dari sekarang.

DAFTAR RUJUKAN

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. Lehninger, A.L, "Dasar-Dasar Biokimia Jilid I", Erlangga, Jakarta, 1982
6. Aris Tjahjoleksono, "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 Keselamat-an dan Metrologi Radiasi, BATAN, Jakarta.
8. Maria Lina R, Budiman Bela dan Andi Yasmon, "Deteksi Mutasi Gen KATG (*Myobacterium Tuberculosis*) 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 $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{ATP}$ 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 $[\gamma\text{-}^{32}P]$ 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, " Sintesa ATP Bertanda P-32 sebagai Perunut Biologi Molekul", Pertemuan Ilmiah Radioisotop, Radiofarmaka dan Siklotron, 2010.

--oooOOOooo--

LAMPIRAN

Tabel 1. Pembuatan larutan campuran A: 100 μL campuran berikut dibuat dalam satu tabung mikro

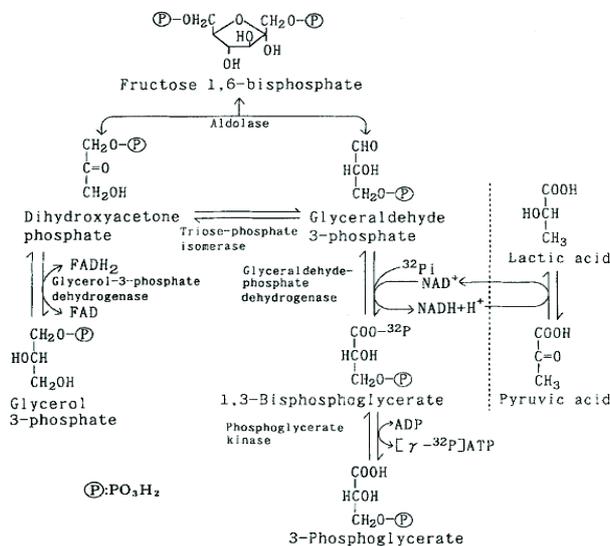
500 mM	Tris-HCl	} (pH 8.0)	50 μL
120 mM	MgCl_2		
1 mM	EDTA		
125 mM	Na piruvat		20 μL
200 mM	Dithiothreitol		15 μL
20 mM	Fructose 1,6-bisphosphate		5 μL
5 mM	ADP		5 μL
20 mM	$\beta\text{-NAD}$		5 μL

Tabel 2. Pembuatan larutan campuran B: 50 μL larutan berikut disiapkan dalam satu tabung mikro

500 mM	Tris-HCl	} (pH 8,0)	5 μL
120 mM	MgCl_2		
1 mM	EDTA		
200 mM	Dithiothreitol		1,5 μL
	Air		43,5 μL

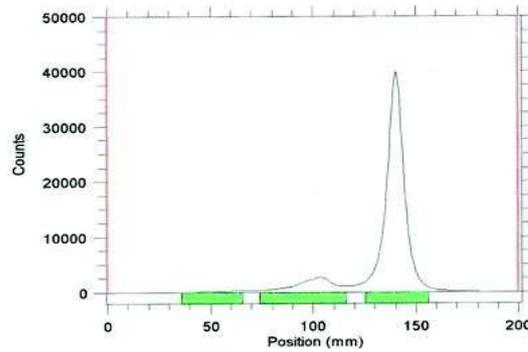
Tabel 3. Pembuatan campuran enzim: 12 μL campuran enzim berikut dibuat didalam satu tabung mikro

Enzim	Vol.	Konsentrasi
Aldolase	6 μL	(0,54 unit)
Glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase	2 μL	(1,6 unit)
Lactate dehydrogenase	2 μL	(2,5 unit)
3-phosphoglycerate kinase	2 μL	(0,9 unit)



Gambar. 1. Bagian dari proses glikolisis dengan reaksi enzimatik pembentukan ADP menjadi ATP dengan penambahan fosfat radioaktif ($\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$)

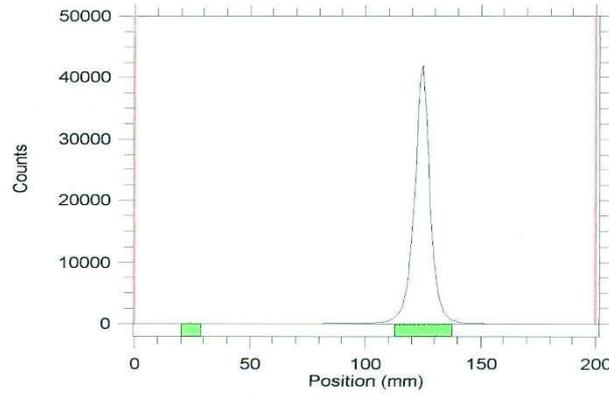
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	35.7	65.9	55.2	0.276	5756.0	11512.0	1.02	1.07
Rgn 2	73.7	116.0	98.9	0.495	67030.0	134060.0	11.84	12.46
Rgn 3	125.5	155.7	140.0	0.700	465390.0	930780.0	82.22	86.48
3 Peaks					538176.0	1076352.0	95.08	100.00



Catatan: $R_f H_3^{32}PO_4 = 0,7$

Gambar 2. Radiokromatogram dari larutan $H_3^{32}PO_4$ sebelum proses pemurnian

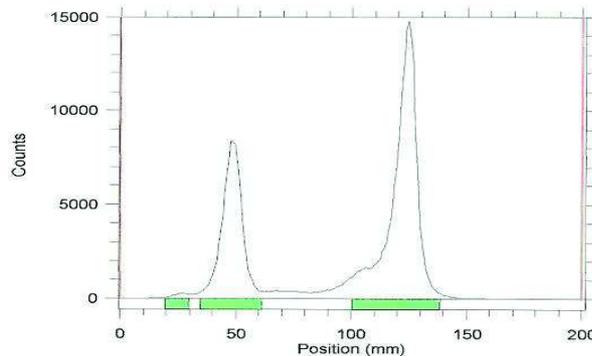
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	20.1	28.8	24.3	0.122	596.0	1192.0	0.15	0.15
Rgn 2	112.5	137.6	124.5	0.623	384120.0	768240.0	96.02	99.85
2 Peaks					384716.0	769432.0	96.17	100.00



Catatan: $R_f H_3^{32}PO_4 = 0,7$

Gambar 3. Radiokromatogram larutan $H_3^{32}PO_4$ setelah proses pemurnian

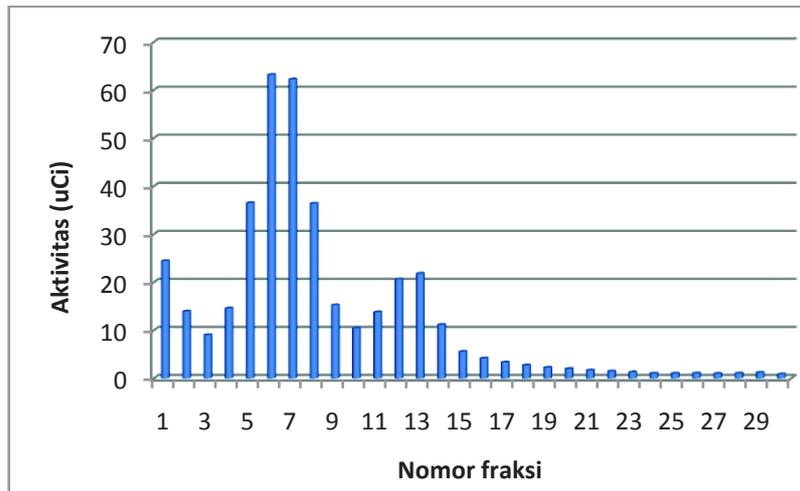
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	19.3	29.6	25.3	0.126	1869.0	3738.0	0.59	0.64
Rgn 2	34.8	61.6	48.2	0.241	98433.0	196866.0	30.35	33.46
Rgn 3	100.4	138.4	121.5	0.608	193860.0	387720.0	60.76	65.90
3 Peaks					294162.0	588324.0	92.20	100.00



Gambar 4. Radiokromatogram pembentukan $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ setelah inkubasi (60) menit

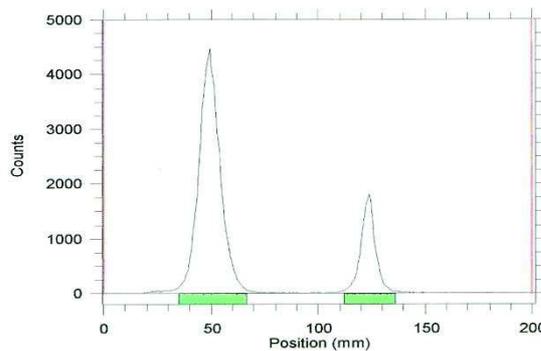
Catatan: $R_f [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} = 0,241$;

$R_f H_3^{32}PO_4 = 0,608$



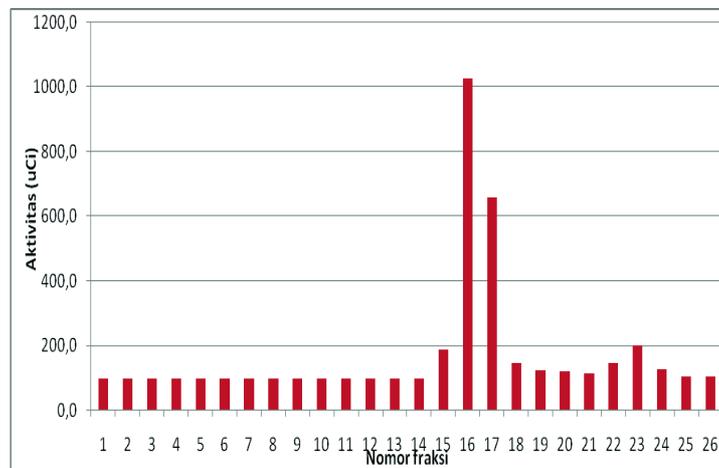
Gambar 5. Profil elusi pemisahan dengan kolom kromatografi penukar anion DEAE-Sephadex menggunakan HCl sebagai larutan pengelusi

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	34.8	66.8	49.5	0.248	59039.0	118078.0	76.45	78.44
Rgn 2	111.7	135.8	123.3	0.617	16227.0	32454.0	21.01	21.56
2 Peaks					75266.0	150532.0	97.47	100.00



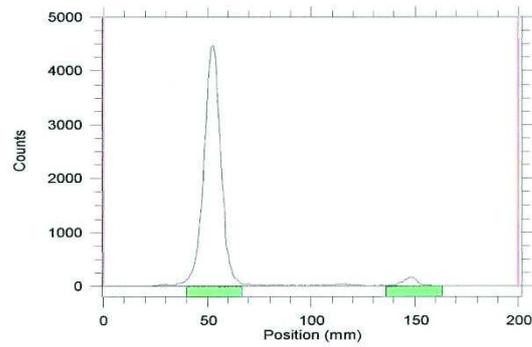
Gambar 6. Radiokromatogram dari hasil proses pemisahan menggunakan HCl sebagai larutan pengelusi

Catatan: $R_f[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} = 0,241$;
 $R_f\text{H}_3^{32}\text{PO}_4 = 0,608$



Gambar 7. Profil elusi pemisahan dengan kolom kromatografi penukar anion DEAE Sephadex menggunakan NH_4HCO_3 sebagai larutan pengelusi

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	40.0	66.8	52.4	0.262	48734.0	97468.0	93.26	96.74
Rgn 2	135.8	163.5	147.5	0.738	1643.0	3286.0	3.14	3.26
2 Peaks					50377.0	100754.0	96.41	100.00



Gambar 8. Radiokromatogram fraksi 23 dari hasil proses pemurnian $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ menggunakan kolom penukar anion DEAE Sephadex dan NH_4HCO_3 sebagai eluen
 Catatan: $R_f [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} = 0,241$;
 $R_f \text{H}_3^{32}\text{PO}_4 = 0,608$