

## SINTESIS DAN KARAKTERISASI NUKLEOTIDA BERTANDA [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP

Wira Y Rahman<sup>a</sup>, Endang Sarmini<sup>a</sup>, Herlina<sup>a</sup>, Abidin<sup>a</sup>, Triyanto<sup>a</sup>, Hambali<sup>a</sup>,  
Santi Nurbaiti<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PTRR) - BATAN)

<sup>b</sup>Kelompok Keahlian Kimia ITB

Corresponding Author:  
Wira Y Rahman  
wira@batan.go.id

Received: Desember 2018  
Accepted: March 2019  
Published: March 2019

Publishing services provided  
by Open Journal Systems

©Wira Y Rahman et al. This  
is an open-access article  
distributed under the terms  
of the Creative Commons  
Attribution License, which  
permits unrestricted use,  
distribution, and  
reproduction in any  
medium, provided the  
original author and source  
are credited.

### ABSTRACT

The utilization of nuclear technology in health sector with molecular techniques is increasingly developed today, especially in Indonesia. One of which is nucleotide compound marked with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP, this compound has been used as tracer for deoxyribonucleic acid (DNA)/ ribonucleic acid (RNA) in the study of various physiological and pathological processes. [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP is synthesized through several stages of continuous reaction in one reaction vessel. It begins with synthesis of [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP through an enzymatic reaction, using  $H_3^{32}PO_4$  and ADP, and enzymes of lactate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate phosphokinase and glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase; followed by phosphorylation of 3'AMP with T4 polynucleotide kinase enzyme to produce 3'-[5'- $^{32}$ P]ATP. The result is hydrolyzed with nuclease P1 enzyme to produce [5'- $^{32}$ P]AMP. The unreacted [ $\gamma$ - $^{32}$ P] is degraded by the addition of hexokinase enzyme and glucose. At the final stage of the reaction, the [5'- $^{32}$ P]AMP is phosphorylated using phosphoenol-piruvat, piruvat kinase, and myokinase to produce [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP. The test results show that the every stage of reaction is characterized using TLC method, PEI cellulose paper as stationary phase and  $KH_3PO_4$  0,5 M pH 3,5 as mobile phase. At the end of reaction, the yield of [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP reaches 71,7%, at  $R_f = 0,2$ .

**Keywords:** *Tracer; Labelled nucleotide[ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP; Synthesis; Enzimatic reaction*

### PENDAHULUAN

Teknologi nuklir telah diaplikasikan pada bidang biologi molekuler, terutama dalam bidang kesehatan sebagai pelacak atau *probe (tracer)*. PAIR (Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi) - BATAN adalah salah satu instansi yang sudah mengembangkan teknologi pelacak nuklir untuk mendeteksi adanya virus HPV (*human papilloma virus*). HPV adalah virus penyebab kanker serviks sedikitnya ada 100 tipe HPV, namun hanya beberapa yang menyebabkan kanker serviks, dengan mendeteksi DNA virus tersebut menggunakan pelacak radioaktif dapat

diketahui apakah virus tersebut menyebabkan kanker atau bukan berdasarkan tipenya.

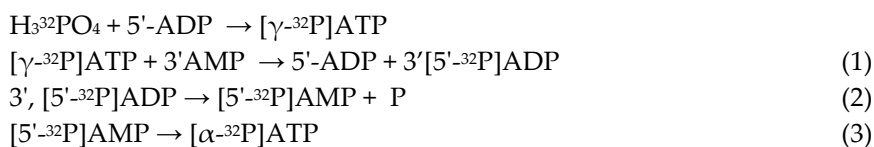
Teknik pendeteksian virus HPV dilakukan dengan cara mengisolasi DNA dari virus HPV tersebut. DNA yang telah diisolasi diamplifikasi menggunakan PCR (*polymerase chain reaction*). Pada proses PCR ini digunakan primer yang telah diberi label radioaktif ([ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP). Sehingga DNA yang diperbanyak akan terlabel radioaktif. Karena selama proses amplifikasi dengan PCR ini akan melalui beberapa tahap denaturasi dari *double strand* menjadi *single strand*, maka digunakan

nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP, dimana radioisotop  $^{32}\text{P}$  pada posisi alpha jauh lebih stabil dibandingkan radioisotop  $^{32}\text{P}$  pada posisi gamma, [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. Primer yang telah berlabel radioaktif ini sangat penting dalam proses deteksi hasil hibridisasi [1,2]. Primer ini akan mengamplifikasi DNA  $\beta$ -globin manusia dan DNA dari HPV. Hasil amplifikasi dihibridisasi menggunakan pelacak (*probe*) spesifik dari *genotype* HPV. Pada proses hibridisasi ini diperlukan sejumlah DNA untai tunggal yang telah ditempelkan pada membran nitroselulosa. Pelacak akan mengikat bagian-bagian yang merupakan komplemennya pada DNA dan "melekat" pada membran. Setelah proses hibridisasi selesai, pelacak yang tidak terikat dicuci dari membran sehingga yang tertinggal hanya hibrid pelacak-DNA pada membran. Pola hibridisasi kemudian dideteksi dengan visualisasi pada film *X-ray* melalui autoradiografi. Hanya bagian-bagian dari sampel tempat lokasi gen yang terlihat sebagai

titik gelap pada film, karena pada bagian tersebut terikat primer berlabel radioaktif [3-5].

Senyawa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP adalah pelacak yang banyak digunakan dalam penelitian biologi molekul. Akan tetapi sampai saat ini ketersediaan senyawa tersebut masih sangat kurang. Oleh karena itu PTRR (Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka) – BATAN sebagai institusi pemerintah dalam bidang litbang radioisotop dan radiofarmaka mengembangkan penelitian senyawa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dari senyawa nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP yang sudah berhasil dibuat oleh PTRR [6-9].

Pada penelitian ini akan dilakukan pembuatan senyawa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP melalui proses enzimatik senyawa nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP [8,9]. Reaksi enzimatik tersebut dapat dilihat pada reaksi berikut ini [10,11] :



Setiap tahap reaksi dimonitor dengan KLT PEI *cellulose* sebagai fasa diam dengan larutan pengelusi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai fasa gerak. Sehingga diharapkan dari penelitian ini bisa diperoleh senyawa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dengan rendemen hasil yang memenuhi persyaratan yang diinginkan.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Bahan Kimia

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  bebas pengemban dengan kemurnian radiokimia diatas 97% yang dibuat oleh Pusat Teknologi Radioisotop dan Radiofarmaka (PRR). Enzim gliseraldehid-3-phosphat dehidrogenase (80 unit/mg) 10 mg/ml, phosphogliserat kinase (450 unit/mg) 10 mg/ml, laktat dehidrogenase, bovine serum albumin, spermin, T4 polynucleotid kinase,

P1-nuclease, phosphoenol pyruvate, pyruvate kinase, myokinase, heksokinase, glucose dithiothreitol, tris-HCl, DL-gliseraldehid 3-fosfat dari Sigma Aldrich. Sedangkan laktat dehidrogenase (250 unit/mg) 5 mg/ml, adenosine monofosfat (AMP), adenosin difosfat (ADP), adenosine trifosfat (ATP),  $\beta$ -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

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian ini adalah sentrifuga berpendingin (*refrigerated centrifuge*) (Labogene 1750R), penangas air (Memmert), *Autoradiography Scanner Cyclon* (Perkin Elmer) dan *Dose calibrator* (Atom Lab 100 plus), *shielding acrylic* dan kontainer Pb

## Prosedur Penelitian

### 1. Proses sintesis [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP

Ke dalam tabung mikro bervolume 2 ml dimasukkan 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  (aktivitas terukur) diatur pH 7-9 dengan larutan 5M NaOH. Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 10  $\mu\text{l}$  campuran enzim gliseraldehid-3-phosphat dehidrogenase, phosphogliserasat phosphokinase dan laktat dehidrogenase. Inkubasi dilakukan selama 20 menit. Reaksi dihentikan dengan memasukkan tabung mikro ke dalam penangas air bersuhu 70°C selama 3 menit untuk menghentikan reaksi enzimatik.

### 2. Reaksi polinukleotida kinase

Ke dalam hasil sintesis [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dimasukkan campuran larutan dari Tris HCl, bovine serum albumin, dithiothreitol, spermin, 3'-AMP serta T4 Polynukleotida kinase. pH larutan ditetapkan 9,0 dengan penambahan 1 M NaOH, reaksi dilakukan selama 16 jam pada temperatur kamar. Reaksi dihentikan pada temperatur 85°C dalam *water bath* selama 3 menit. Setelah reaksi selesai, hasil akhir tahap ini diuji dengan KLT PEI Cellulose.

### 3. Reaksi P1-nuklease

Enzim P1-nuklease (10-25  $\mu$ ) yang telah dilarutkan dengan 70  $\mu\text{L}$  Tris HCl 50 mM (pH 8,0) dimasukkan ke dalam larutan hasil reaksi polinukleotida kinase yang telah diatur pH-nya. Reaksi diinkubasikan selama 30 menit pada temperatur kamar. Reaksi dihentikan pada temperatur 85°C dalam *water bath* selama 3 menit. Setelah reaksi selesai, hasil akhir tahap ini diuji dengan KLT PEI Cellulose.

### 4. Degradasi senyawa [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP

Jika reaksi tahap 2 masih terdapat [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP > 1% maka sebelum reaksi tahap 3 [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP harus didegradasi terlebih dahulu dengan menambahkan glukosa dan heksokinase.

### 5. Reaksi konversi [ $5'$ - $^{32}\text{P}$ ]AMP menjadi [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP

Ke dalam hasil degradasi senyawa [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dimasukkan campuran larutan Tris-HCl, magnesium klorida, kalium iodida, dithiothreitol, phosphoenolpyruvate, ATP dan campuran enzim pyruvate kinase dengan myokinase. Reaksi diinkubasikan selama 30 menit pada temperatur kamar. Reaksi dihentikan pada temperatur 85°C dalam *water bath* selama 3 menit. Setelah reaksi selesai, hasil akhir tahap ini diuji dengan KLT PEI Cellulose.

### 6. Analisa hasil sintesis [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP.

Fraksi-fraksi dengan aktivitas yang besar dianalisa kemurnian radiokimianya menggunakan KLT PEI Cellulose sebagai fasa diam dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai fasa gerak. Kemudian ditentukan  $R_f$ -nya dengan *autoradiography scanner*.

## HASIL DAN DISKUSI

Hasil analisa pemurnian senyawa  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  menggunakan kromatografi lapis tipis, dengan PEI Cellulose sebagai fasa diam dan larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai fasa gerak, menunjukkan bahwa  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  mempunyai kemurnian 99,9% dengan  $R_f$  0,8, dari hasil analisa ini menunjukkan bahwa  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  masih dalam bentuk ortofosfat, tidak berubah membentuk senyawa polifosfat (meta-, *pyro*-). Dengan terbentuknya senyawa polifosfat (meta-, *pyro*-) akan menghambat kerja enzim.

Pembuatan senyawa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP melalui beberapa tahap proses reaksi. Pembentukan senyawa nukleotida bertanda diawali dengan membuat nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP dari senyawa  $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$  dan ADP melalui reaksi enzimatik. Hasil analisa sintesa dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil sintesa tersebut diperoleh rendemen  $^{32}\text{P}$ ]ADP yang terbentuk 86,3% terlihat pada  $R_f$  0,4 (Gambar 2) Dari hasil analisa menggunakan KLT PEI Cellulose 3' [ $5'$ - $^{32}\text{P}$ ]ADP pembentukan nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP sebesar 91,4% dengan  $R_f$  0,2, dengan kemurnian sebesar ini dapat langsung digunakan tanpa melalui

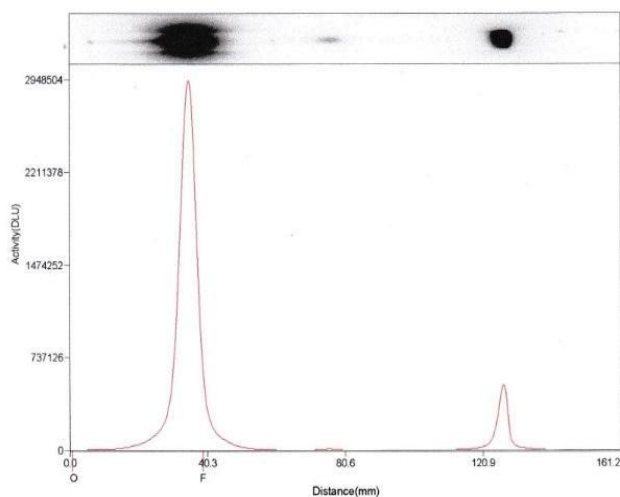
proses pemisahan untuk proses sintesa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP.

Proses sintesa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP melalui 3 tahap reaksi. Pada tahap pertama dengan menambahkan enzim T4 polinukleotida kinase, pada tahap ini akan terbentuk 3'[5'- $^{32}\text{P}$ ]ADP. Pada tahap ini enzim T4 polinukleotida kinase akan mentransfer fosfat radioaktif pada posisi [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP ke nukleotida 3'AMP menjadi 3'[5'- $^{32}\text{P}$ ]ADP dapat dilihat pada reaksi Gambar 3.

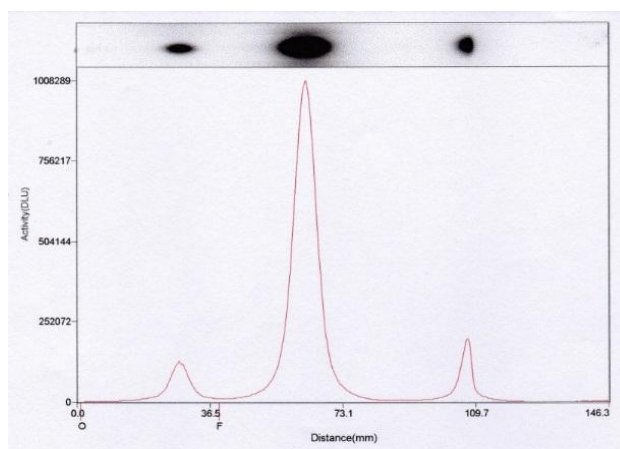
Reaksi diteruskan ke tahap 2 dengan menghidrolisis 3'[5'- $^{32}\text{P}$ ]ADP menjadi [5'- $^{32}\text{P}$ ]AMP dengan enzim nuklease P1. Enzim nuklease P1 akan menghidrolisis fosfat pada

pada posisi 3'ADP sehingga terlepas membentuk fosfat bebas tidak radioaktif. Pada tahap ini radioisotop  $^{32}\text{P}$  sudah berada pada posisi  $\alpha$  di 5' dapat dilihat pada reaksi Gambar 4.

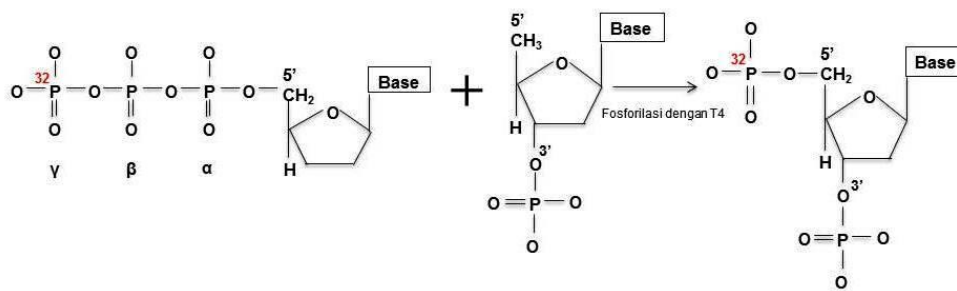
Dari reaksi tahap (1) masih terdapat [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP lebih dari 1%, maka harus didestruksi terlebih dahulu karena akan mengkontaminasi hasil akhir sintesis yang diinginkan. Untuk mendestruksi [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP yang tidak bereaksi pada tahap (1) digunakan enzim heksokinase dan glukosa. Akhirnya senyawa [5'- $^{32}\text{P}$ ]AMP difosforilasi (3) dengan fosfoenolpiruvat, piruvat kinase dan myokinase untuk menghasilkan [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP.



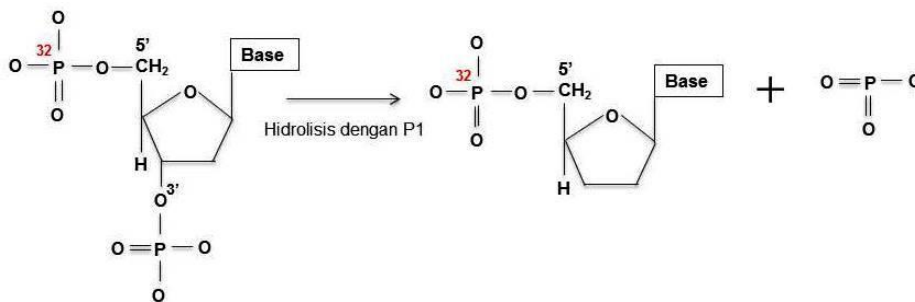
**Gambar 1.** Hasil analisa proses sintesa nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP



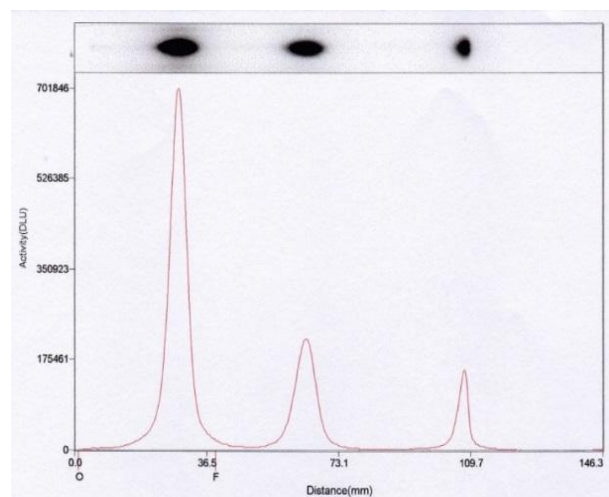
**Gambar 2.** Hasil analisa proses sintesa nukleotida bertanda [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP tahap 1



Gambar 3. Reaksi fosforilasi dengan enzim T4 polinukleotida kinase



Gambar 4. Hidrolisis dengan enzim nuklease P1 reaksi tahap 2



Gambar 5. Kromatogram hasil sintesa nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP pada tahap 3 akhir proses

Dari Gambar 5. memperlihatkan rendemen hasil sintesa diperoleh [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP sebesar 71,7 % dengan  $R_f$  0,2. Hasil yang diperoleh kurang memuaskan, kemungkinan disebabkan oleh aktifitas enzim nuklease P1 yang digunakan untuk membentuk senyawa [ $5'$ - $^{32}$ P]AMP belum optimal. Selain itu kemungkinan ada inhibitor enzim yang terdapat pada enzim yang digunakan seperti amonium fosfat, perlu dilakukan pencucian terlebih dahulu terhadap enzim yang digunakan.

### KESIMPULAN

Proses pembuatan nukleotida bertanda [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP dari reaksi enzimatis [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP telah berhasil dilakukan. Akan tetapi rendemen hasil yang diperoleh 71,7% masih dibawah yang diharapkan. Sehingga masih perlu ditingkatkan reaksi enzimatis [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP agar diperoleh rendemen [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP yang tinggi.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Rosilawati, M.L., Bela, B., & Indarti, J., Deteksi Human Papillomavirus (HPV) Tipe 16 dan Tipe 18 Dengan Teknik Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Hibridisasi Dot Blot dengan Pelacak DNA Berlabel Biotin. *Maj. Obstet. Ginekol. Indones.*, **31**(4): 218-225(2007).
2. Novel, S. S., Safitri, R., Harijanto, S. H., & Nuswantara, S., Perbandingan Beberapa Metode Molekuler dalam Uji DNA HPV (Human Papillomavirus), *Cermin Dunia Kedokteran*, **38**(5): 356-382 (2011).
3. Maria Lina R., Bela, B., & Yasmon, A., Deteksi Mutasi Gen KATG (Myobacterium Tuberculosis) dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction) Hibridisasi Dot Blot menggunakan Pelacak Oligonukleotida Bertanda  $^{32}\text{P}$ . *JAIR*, **5**(1): 54-67 (2009).
4. Lehninger, A.L., *Dasar-Dasar Biokimia Jilid I*, Erlangga (1982).
5. Hanson, James R., *The Organic Chemistry of Isotopes Labelling*, Royal Society of Chemistry (2011).
6. Sakamoto, F., Izumo, M., Hashimoto, K., & Fuji, Y., Study of Optimum Condition for Synthesis of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  with High Specific Radioactivity, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **239**(2) 423-427 (1999).
7. Schendel, Paul F., and Wells, & Robert D., The Synthetic and Purification of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  Adenosine Triphosphate with High Specific Activity, *J. Biol. Chem.*, **248**(23): 8319-8321 (1973).
8. Sarmini, E., Herlina, Triyanto, Hambali, Muthalib, A., & Nurbaiti, S., Sintesa ATP Bertanda P-32 sebagai Perunut Biologi Molekul, *JRR*, **14**(1): 9-16 (2011).
9. Rahman, Wira Y., Awaludin, R., Sarmini, E., Herlina, Triyanto, Ritawidya R., Mutalib, A., & Nurbaiti, S., A Modified Method for Synthesis of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  Labelled Adenosine Triphosphate, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **302**(3): 1607-1611 (2015).
10. Reeve, Anthony E., Chih, R., & Huang, C., A method for the enzymatic synthesis and purification of  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  nucleoside triphosphate, *Nucleic Acids Res.*, **6**(1): 81-90 (1979).
11. Symons, Robert H., The Rapid, Simple and Improve Preparation of High Specific Activity  $\alpha\text{-}[\text{}^{32}\text{P}]\text{dATP}$  and  $\alpha\text{-}[\text{}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . *Nucleic Acids Res.*, **4**(12): 4347-4355 (1977).