

PENENTUAN METABOLIT BENZO(α)PIREN DI DALAM SEL KHAMIR (*Saccharomyces cerevisiae* A3)

Nurhayati T.*, Soedigdo P.**, S. Soedigdo**

*Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

**Pusat Antar Universitas - Institut Teknologi Bandung

ABSTRAK

PENENTUAN METABOLIT BENZO(α)PIREN DI DALAM SEL KHAMIR (*Saccharomyces cerevisiae* A3). Sejauh ini tahapan metabolisme benzo(α)piren (BP) di dalam sel mamalia masih belum jelas. Mengingat jaringan mamalia itu kompleks sifatnya, diharapkan dengan menggunakan khamir-eukariot unisel ini, jalur metabolisme yang masih kabur yang dijumpai di dalam sel mamalia dapat diuraikan secara sederhana. Pada studi sebelumnya telah dibuktikan bahwa sel khamir (*Saccharomyces cerevisiae* A3) menyerap BP(BP- 14 C) yang ada di dalam media perbenihannya. Selanjutnya diteliti metabolit BP di dalam lisat sel khamir dan residu media dengan kromatografi lapisan tipis (KLT). Sebagai pembanding digunakan larutan standar BP. Hasil menunjukkan bahwa untuk ekstrak sel khamir dan residu media dijumpai hanya satu noda pada kromatogram dengan harga rata-rata Rf masing-masing $0,85 \pm 0,02$ dan $0,84 \pm 0,03$ dan ini berbeda tidak nyata dengan noda yang didapat pada kromatogram larutan standar BP yang harga Rf-nya $0,81 \pm 0,003$.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF BENZO(α)PYRENE METABOLITES IN YEAST CELL (*Saccharomyces cerevisiae* A3). The stages of benzo(α)pyrene (BP) metabolism in mammalian cell is still not clear so far. Considering to the complexity of the mammalian tissue, it is hoped that by using yeast-unicellular eukaryote the obscured metabolism pathway met in mammalian cell can be simply analyzed. It has been found on the former study that yeast cells absorbed BP(BP- 14 C) that was added to its growth media. Being interested in knowing the fate of BP in yeast cell, an identification on BP metabolite using thin layer chromatography was done on yeast lysate and residual media as well. The latter was done to study the mode of action of yeast cell in metabolizing BP. The chromatograms obtained were compared with the one from BP standard solution. The result shows that there was only one spot found on each chromatogram with the Rf values of 0.85 ± 0.02 and 0.84 ± 0.03 respectively. Compared with the Rf value of standard BP (0.81 ± 0.003) those were insignificantly different.

PENDAHULUAN

Pada studi sebelumnya telah dibuktikan bahwa sel khamir (*S. cerevisiae* A3) menyerap benzo(α)pirena- 14 C (BP- 14 C) yang terdapat di dalam media perbenihannya (1). Sejauh ini metabolisme senyawa tersebut di dalam hewan tingkat tinggi, masih belum jelas diketahui. Hal ini diduga disebabkan adanya kerumitan pada struktur DNA dan juga belum diketahuinya interaksi antar sel pada hewan tingkat tinggi tersebut.

Ada dua pendapat yang cukup kuat mengenai mekanisme karsinogenesis dari BP. Pendapat pertama ialah dari Boyland dan kawan-kawan (2,3), yang menyatakan bahwa senyawa tersebut akan dioksidasi in vivo oleh sitokrom P₄₅₀ menjadi epoksida. Selanjutnya epoksida tersebut akan bereaksi dengan DNA sehingga mengakibatkan terganggunya sistem koordinasi DNA. Berikut ini adalah pendapat dari Fleisher dan kawan-kawan (4) yang menyatakan

bahwa BP akan mengalami hidrosimetilasi, selanjutnya ion karbonium yang terbentuk berikatan dengan DNA sel. Kedua pendapat tersebut masih tetap bertahan. Untuk mengatasi kerumitan proses karsinogenesis pada hewan tingkat tinggi ini, selanjutnya muncul suatu gagasan untuk menggunakan hewan tingkat rendah sebagai obyek penelitian karsinogenesis. Hal itu telah dirintis oleh Mulyadi (5) yaitu dengan menggunakan *Turbellaria*. Hasil yang diperoleh belum juga dapat menjawab secara tuntas masalah-masalah pada proses karsinogenesis.

Akhir-akhir ini untuk studi semacam itu beberapa orang mencoba menggunakan eukariot unisel seperti khamir (*S. cerevisiae*) untuk menjawab masalah karsinogenesis dan uji karsinogenitas (6,7). Mengingat kesederhanaan struktur intrasel yang ada pada mikroorganisme tersebut, diharapkan proses metabolisme

BP di dalam sel khamir sederhana dan mudah ditelusur. Dengan demikian, selanjutnya diharapkan dapat diperoleh kejelasan mengenai mekanisme karsinogenesisnya sendiri.

BAHAN, ALAT DAN TATAKERJA

Khamir yang digunakan di dalam penelitian ini ialah *Saccharomyces cerevisiae* A3, yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Institut Teknologi Bandung. Benzo(α)piren (BP) diperoleh dari Fluka. Lapisan tipis yang digunakan ialah Silica gel F₂₅₄ dari Kodak. Pereaksi lain yang digunakan dalam derajat kemurnian analitik dan air yang dimaksud di dalam penelitian ini ialah air suling.

Khamir *S. cerevisiae* A3 ditumbuhkan dari media glukosa 2% ke media etanol 1%, diperoleh khamir etanol. Khamir etanol pertama ini diulangbiakkan dalam media etanol sebanyak dua kali, agar diperoleh biakan khamir yang mapan tumbuh dalam media etanol. Selanjutnya khamir etanol inilah yang digunakan di dalam penelitian ini.

Khamir etanol ditumbuhkan di dalam medium etanol 1% yang ditambahkan larutan BP 0,01% sehingga konsentrasi BP di dalam media menjadi 0,001%. Khamir dipanen pada fase stasioner (24 jam setelah pembenihan). Cara memanen dengan sentrifugasi pada suhu rendah (2 - 4°C), kecepatan putaran 4000 rpm dan selama 15 menit. Endapan khamir dipisahkan dari residu media. Residu media ditampung dan khamir dicuci secara sentrifugasi 3 kali dengan kecepatan yang sama seperti pengendapan dan waktu untuk masing-masing penyucian 10 menit. Selanjutnya, khamir ini dinamakan khamir BPF1 dan residu media dinamakan RMF1. Dengan cara yang sama dibuat khamir BPF5, BPF10 dan BPF15. Begitu pula untuk residu media RMF5, RMF10 dan RMF15. Pengulangan pembiakan di dalam media yang mengandung BP ini adalah untuk mengetahui adanya tahapan mekanisme transformasi BP di dalam sel khamir.

Metabolit BP dipelajari di dalam sel khamir. Untuk memastikan lokasi pengolahan BP sebenarnya, maka dipelajari pula metabolit BP di dalam residu media.

Tahapan kerja dilakukan sebagai berikut:

Terhadap sel khamir

Sel khamir yang telah dikenakan BP dibilas dengan etanol 70%, untuk membebaskan BP yang melekat pada permukaan dinding sel khamir. Setelah itu sel dipecah dengan sonifikasi. Selanjutnya homogenat sel khamir ini

disuspensikan dalam etil asetat dengan perbandingan 2:5 (v/v). Dikocok dalam corong pemisah agar BP dan metabolitnya terekstraksi di dalam etil asetat.

Selanjutnya campuran ini dipekatkan dengan cara menguapkan etil asetat dengan rotavapor, sampai volumenya menjadi 1/5 - 1/10 dari volum semula. Untuk mengetahui nasib BP di dalam sel khamir, maka dilakukan pemisahan dengan kromatografi lapis tipis (8). Untuk ini digunakan silica gel 60 F₂₅₄ dan sebagai eluen ialah bensen:etanol dengan perbandingan 8 : 2 (v/v). Kromatogram dibaca di bawah sinar u.v. pada panjang gelombang 253,7 dan 375 nm.

Terhadap residu media

BP dan kemungkinan metabolitnya yang terdapat di dalam residu media ini diekstraksi dengan etil asetat 3 kali, dengan perbandingan 5 : 2. Cara ekstraksi sama seperti yang dilakukan untuk suspensi homogenat sel khamir.

Perlakuan selanjutnya terhadap ekstrak yang diperoleh juga sama seperti yang dilakukan untuk ekstrak yang diperoleh dari sel khamir.

Sebagai pembanding dipelajari juga ekstrak sel khamir etanol yang tidak dikenakan BP (normal), residu mediumnya dan larutan BP (0,01%) sebagai standar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil studi metabolit BP di dalam sel khamir dapat dilihat pada Gambar 1 dan Gambar 2 menunjukkan metabolit yang ditemukan di dalam residu media.



Gambar 1. Kromatogram lisat sel khamir yang dikenakan BP pada berbagai ulangan biakan, khamir normal dan standar BP.



Gambar 2. Kromatogram residu media yang mengandung BP, media normal dan standar BP.

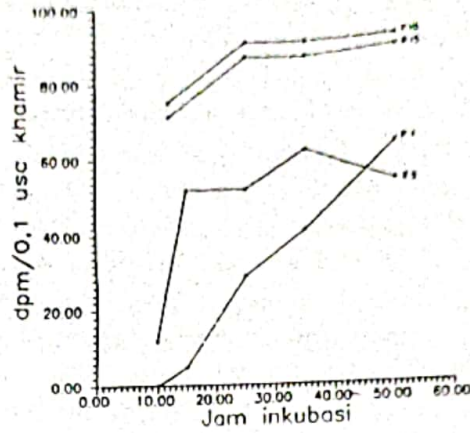
Dari hasil yang di dapat tampak bahwa jumlah noda baik pada kromatogram lisat sel khamir maupun residu media hanya satu dengan harga Rf seperti yang tertera pada Tabel dibawah ini.

Melihat intensitas perpendaran noda pada

Tabel. Daftar Rf kromatogram lisat khamir yang dikenakan BP dan residu medianya.

Zat	St	N	BPF1	BPF5	BPF10	BPF15
Lisat khamir	-	-	0,82	0,85	0,87	0,84
Residu media	-	-	0,81	0,88	0,86	0,82
BP	0,81	-	-	-	-	-

kromatogram lisat khamir tampak bahwa ada tahap peningkatan penyerapan BP oleh mikro organisme tersebut dari ulangan biakan pertama (BPF1) sampai ulangan biakan ke 10 (BPF10). Pada ulangan biakan ke 15, tampak intensitas perpendaran menurun kembali. Pola perpendaran ini menyerupai pola laju penyerapan BP (Gambar 3). Tahapan penyerapan yang terjadi ini menggambarkan adanya mekanisme adaptasi khamir terhadap hidrokarbon



Gambar 3. Laju penyerapan BP-¹⁴C.

poli inti tersebut (BP). Suatu saat kumulasi penyerapan BP di dalam sel khamir mencapai harga kejenuhan, pada keadaan demikian, maka laju penyerapan menurun kembali (BPF15).

Selanjutnya melihat harga Rf yang didapat pada kromatogram lisat khamir dan residu media, kemudian dibandingkan dengan Rf standar BP, tampaknya kedua harga tersebut tidak berbeda nyata. Hal ini dapat diartikan bahwa baik di dalam sel khamir maupun pada residu media, BP tidak mengalami perubahan. Melihat hasil yang diperoleh, dapat diperkirakan bahwa *S. cerevisiae* A3 tidak mempunyai enzim metabolik untuk BP, yaitu sitokrom P₄₅₀. Untuk tujuan uji karsinogenitas, tampaknya khamir ini perlu direkayasa dahulu seperti halnya yang dilakukan oleh Gautier dkk. (9).

KESIMPULAN

Mengamati hasil yang diperoleh, dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut :

1. Penyerapan BP (BP-¹⁴C) oleh khamir dilakukan secara berangsur, disesuaikan dengan kemampuan adaptasinya terhadap medium perbenihan yang mengandung karsinogen tersebut.
2. Sejauh ini dengan perbandingan harga Rf noda dari lisat sel khamir dan residu media terhadap harga Rf noda standar BP, tampaknya *S. cerevisiae* A3 tidak mampu mengubah BP menjadi suatu senyawa lain.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tanudjojo, N., Soedigdo, P. dan Soedigdo, S., Studi pendahuluan transpor BP-¹⁴C melalui membran sel ragi, disajikan pada Kolokium Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Batan, Bandung (Juli 1989).
2. Boyland, E. and Sims, P., The metabolism of 7,12- dimethylbenz(α)anthracene by rat liver homogenates, *Biochem. J.*, 95 (1965) 780-787.
3. Boyland, E. and Sims, P., The carcinogenic activities in mice of compounds related to benz(α)anthracene, *J. Cancer*, 2 (1967) 500-504.
4. Flesher, J.W. and Sydnor, K.L., Possible role of 6-hydroxymethylbenzo(α)pyrene as proximate carcinogen of benzo(α)pyrene and 6-methylbenzo(α)pyrene, *Int. J. Cancer*, 11 (1973) 433-437.
5. Mulyadi, Pengaruh benzo(α)pirena dan 7,12- dimetilbenz(α)antrasena terhadap Turbellaria, Disertasi, Institut Teknologi Bandung (1982).
6. Eckardt, F., H. Muliawan, N. de Ruiter and H. Kappus Rat hepatic vinyl chloride metabolites induce gene conversion in the yeast strain D7RAD in vitro and in vivo, *Mutation Research*, 91 (1981) 309-324.
7. Callen, D.F., Wolf, C.R. and Philpot, R.M., Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbon in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 77 (1980) 55-63.
8. Stahl, E., Thin Layer Chromatography, 2nd ed., Springer Ver Lag, Berlin (1969).
9. Gautier, J.C., Urban, P., Beaune, P. and Pompon, D., Engineered Yeast Cells as Model to Study Coupling Between Human Xenobiotic Metabolizing Enzymes-Simulation of the 21st Steps of Benzo(α)pyrene Activation, *European Journal of Biochemistry* 211, 1-2 (Jan 1993) 63 - 72