

PENGGUNAAN METODE RADIOASSAY TEKNIK FASE PADAT DALAM REAKSI FIKSASI α -KOBROTOKSIN TERHADAP RESEPTOR KOLINERGIK

3

Nurlaila Z.

Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknik Nuklir-BATAN, Bandung

ABSTRAK

PENGGUNAAN METODE RADIOASSAY TEKNIK FASE PADAT DALAM REAKSI FIKSASI α -KOBROTOKSIN TERHADAP RESEPTOR KOLINERGIK. α -Kobratoksin merupakan suatu protein yang terkandung dalam bisa ular *Naja naja kaouthia*. Bila masuk ke dalam tubuh akan terfiksasi pada reseptor kolinergik sehingga mengakibatkan terjadinya kelumpuhan pada otot serta pernafasan. Penentuan gugus aktif dalam fiksasi ini dapat dilakukan dengan metode *radioassay* menggunakan teknik penyaringan berdasarkan reaksi kompetisi antara α -kobratoksin yang dimodifikasi pada gugus tertentu dengan α -kobratoksin bertanda radioaktif. Selain itu, gugus aktif tersebut dapat ditentukan juga dengan metode *radioassay* teknik fase padat menggunakan reseptor kolinergik yang disalut pada lubang plat ELISA. Telah dilakukan penentuan kondisi optimal metode *radioassay* dengan teknik fase padat dalam reaksi fiksasi α -kobratoksin terhadap reseptor kolinergik menggunakan α -kobratoksin bertanda tritium (^3H - α -kobratoksin). Kondisi reaksi fiksasi optimal dicapai pada penggunaan 20 μg reseptor kolinergik yang disalut pada lubang plat ELISA dengan radioaktivitas antara $5,0 \cdot 10^4$ hingga $7,5 \cdot 10^4$ cpm dan waktu inkubasi minimal 4 jam pada temperatur kamar. Reaksi kompetisi antara ^3H - α -kobratoksin dan α -kobratoksin terhadap reseptor kolinergik memberikan harga kompetisi inhibisi (IC_{50}) sebesar $6,50 \cdot 10^{-9}$ M. Pengujian metode ini menggunakan derivat (N_ϵ -asetil-lisin-23) α -kobratoksin menunjukkan bahwa senyawa tersebut terinhibisi untuk terfiksasi pada reseptor kolinergik dengan $\text{IC}_{50} = 9,50 \cdot 10^{-9}$ M. Dari percobaan diperoleh bahwa metode ini dapat digunakan untuk menentukan gugus aktif suatu toksin, yang berfungsi dalam reaksi fiksasi pada reseptor kolinergik.

ABSTRACT

USING OF SOLID PHASE RADIOASSAY METHOD IN THE FIXATION REACTION OF α -COBRATOXIN TO CHOLINERGIC RESEPTOR. α -cobratoxin is a protein that is in the snake venom of *Naja naja kaouthia*. If, it enter into the body, would be fixed specifically to the cholinergic receptor, causing muscle and breathing paralyze. Determination of functional groups in this fixation could be accomplish by filtration radioassay method with labelled radioactive α -cobratoxin. Beside that, the functional groups in this fixation could be determined by solid phase radioassay method. The determination of optimum condition of α -cobratoxin fixation to cholinergic receptor with labeled tritium α -cobratoxin (^3H - α -cobratoxin) using this method has been carried out. Optimum condition of fixation was reached at 20 μg of cholinergic receptor coated on the ELISA plat with ^3H - α -cobratoxin activity range $5.0 \cdot 10^4$ to $7.5 \cdot 10^4$ cpm and 4 hours of minimum time incubation at room temperature. Competitive reaction between ^3H - α -cobratoxin and α -cobratoxin to the cholinergic receptor gave $6.50 \cdot 10^{-9}$ M of the 50% of inhibition competitive value (IC_{50}) Evaluation of this method using (N_ϵ -acetyl-lysin-23) α -cobratoxin derivative showed that the compound was inhibited in the fixation to cholinergic receptor with $\text{IC}_{50} = 9.50 \cdot 10^{-9}$ M. From this experiment was obtained that this method could be used to determine the active group of the toxin which function in the fixation reaction to cholinergic receptor.

PENDAHULUAN

α -Kobratoksin yang dikenal dengan toksin 3 adalah suatu neurotoksin yang terkandung di dalam bisa ular jenis *Naja naja kaouthia*. Senyawa ini merupakan suatu protein yang sangat toksik yang terdiri dari 71 asam amino dengan 5 jembatan disulfur (Gambar 1) [1]. Bila terkena gigitan ular, bisa ular tersebut masuk ke dalam tubuh dan akan terfiksasi pada reseptor kolinergik yang terdapat pada membran post sinaptik sehingga menghambat neurotransmitter pada *junction* saraf motorik dan otot, yang mengakibatkan terjadinya kelumpuhan pada otot serta pernafasan [2].

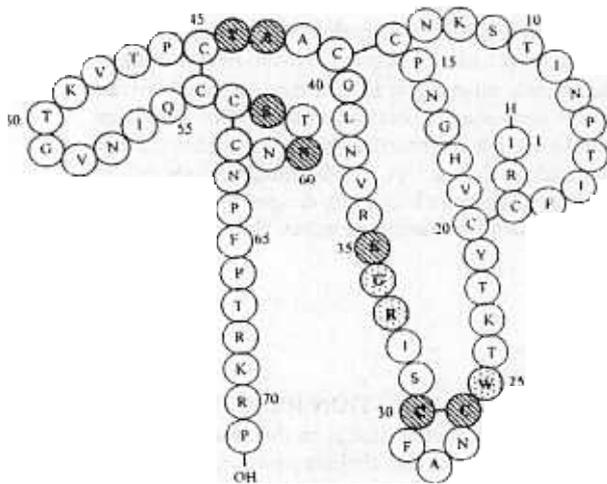
Beberapa metode dapat digunakan untuk mengetahui gugus yang berfungsi dalam reaksi fiksasi terhadap reseptor kolinergik antara lain *radioassay* dan

enzyme immunoassay. Cara yang paling sering digunakan adalah metode filtrasi menggunakan perunut radioaktif berdasarkan reaksi kompetisi antara neurotoksin yang dimodifikasi pada gugus tertentu dengan perunut yang digunakan dimana modifikasi kimia gugus tertentu suatu neurotoksin dapat mempengaruhi aktivitas biologik neurotoksin tersebut. Adanya reaksi yang spesifik antara neurotoksin dengan reseptor kolinergik serta besarnya molekul senyawa reseptor membran mengakibatkan hasil ikatan kedua senyawa tersebut dapat dipisahkan dari pereaksi lainnya dengan cara penyaringan.

Dalam metode ini, penyaringan untuk satu seri pengerjaan memerlukan waktu yang cukup lama, selain itu, volume pereaksi yang digunakan relatif besar dimana volume akhir larutan $\pm 1,2$ ml. Untuk itu dikembangkan

metode alternatif yaitu metode *radioassay* dengan teknik fase padat. Dalam metode ini digunakan juga isotop radioaktif sebagai perunut dan sebagai fase padat adalah reseptor kolinergik dalam jumlah tertentu yang disalut pada lubang plat ELISA, dan volume akhir per lubang plat ELISA relatif kecil yaitu 250 µl.

Dalam penelitian ini, dilakukan penentuan kondisi optimal teknik tersebut untuk senyawa α-kobratoksin dengan memvariasi beberapa parameter antara lain jumlah reseptor kolinergik yang disalut pada lubang plat ELISA, jumlah perunut radioaktif ³H-α-kobratoksin dan waktu inkubasi. Selain itu, dilakukan pula reaksi kompetisi antara α-kobratoksin dan derivatnya dengan ³H-α-kobratoksin terhadap reseptor kolinergik tersebut pada kondisi optimal yang diperoleh dari percobaan di atas.



Gambar 1. Struktur primer α-kobratoksin *Naja naja kaouthia*

Keterangan :

A (alanin), C (sistein), F (fenilalanin), G (glisin), H (histidin), I (isoleusin), K (lisin), L (leusin), H (asparagin), P (prolin), Q (glutamin), R (arginin), S (serin), T (treonin), V (valin), W (triptofan), Y (tirosin)

Penelitian ini dimaksudkan untuk memperoleh kondisi optimal metode *radioassay* teknik fase padat, yang dapat digunakan untuk menentukan gugus aktif suatu toksin dalam reaksi biologiknya terhadap reseptor kolinergik.

BAHAN DAN PERALATAN

α-kobratoksin dan derivatnya (N_ε-asetil-lisin-23)α-kobratoksin, ³H-α-kobra-toksin, reseptor kolinergik dari organ elektrik *Torpedo marmorata* diperoleh dari LIP-Commisariat l'Energy d'Atomic, Perancis. Bovine Serum Albumin (BSA) dari Fluka, Aqualuma, serta pereaksi-pereaksi lain dengan kualitas untuk analisis buatan E.Merck dan Prolabo.

Alat yang digunakan antara lain pencacah sintilasi cair, spektrometer UV-VIS model Cary 210, plat ELISA

Nunc Immuno type Maxisorb serta alat penunjang lainnya.

TATA KERJA

Penentuan jumlah optimal reseptor kolinergik yang disalut pada plat ELISA

Penyalutan plat ELISA dengan reseptor kolinergik dilakukan dengan memodifikasi metode Nilson [4].

Ke dalam lubang plat ELISA dari kolom 3 sampai dengan 12 dimasukkan 100 µl larutan reseptor kolinergik dalam dapar reseptor (dapar fosfat 0,1M, pH 7,4; BSA 0,1%) dengan jumlah yang bervariasi untuk setiap lubang (0; 2,5; 5; 10; 20; 30; 40; 50 µg). Plat diinkubasi selama minimal 8 jam pada temperatur 4 °C, kemudian dicuci dengan dapar pencuci (dapar fosfat 0,1M, pH 7,4). Selanjutnya dijenuhkan dengan penambahan 250 µl larutan BSA 0,3% dalam dapar fosfat 0,1M, pH 7,4 (termasuk kolom 2 yang dipakai sebagai blanko atau untuk penentuan ikatan non spesifik) dan diinkubasi selama minimum 6 jam pada temperatur 4 °C. Plat ELISA yang telah disalut dengan reseptor kolinergik, dicuci beberapa kali dengan dapar pencuci, kemudian ke dalam masing-masing lubang ditambahkan 200 µl ³H-α-kobratoksin dengan radioaktivitas ± 10⁵ cpm dan diinkubasi selama minimal 8 jam pada temperatur 4 °C. Plat dicuci kembali, kemudian ditambahkan 250 µl larutan NaOH 0,05M dan dinkubasi selama 2 jam pada temperatur kamar. Selanjutnya larutan NaOH tersebut dicacah menggunakan pencacah sintilasi cair dengan bantuan aqualuma. Secara paralel dilakukan juga penentuan fiksasi non spesifik dimana selain ditambahkan larutan ³H-α-kobratoksin pada masing-masing lubang, ditambahkan juga larutan α-kobratoksin dalam jumlah berlebih (200 kali) terhadap ³H-α-kobratoksin.

Penentuan radioaktivitas optimal ³H-α-kobratoksin dalam reaksi fiksasi terhadap reseptor kolinergik yang disalut pada plat ELISA

Plat ELISA yang telah disalut dengan reseptor kolinergik dengan jumlah optimal seperti yang diperoleh pada percobaan di atas, dicuci beberapa kali dengan dapar pencuci. Pada masing-masing lubang ditambahkan 200 µl larutan ³H-α-kobratoksin dengan aktivitas yang bervariasi dan diinkubasi selama minimal 8 jam pada temperatur 4 °C. Pengerjaan selanjutnya dilakukan seperti di atas termasuk juga penentuan fiksasi non spesifik.

Penentuan waktu inkubasi ³H-α-kobratoksin terfiksasi pada reseptor kolinergik

Lubang plat ELISA yang telah disalut dengan jumlah optimal reseptor kolinergik, dicuci beberapa kali dengan dapar pencuci. Kemudian ke dalam lubang tersebut ditambahkan 200 µl larutan ³H-α-kobratoksin dengan radioaktivitas optimal dan plat diinkubasi dengan waktu yang bervariasi. Pengerjaan selanjutnya dilakukan seperti di atas termasuk juga penentuan fiksasi non spesifik.

Reaksi kompetisi ^3H - α -kobatoksine pada reseptor kolinergik dengan adanya α -kobatoksine dan derivatnya (N_ϵ -asetil-lisin-23) α -kobatoksine

Lubang plat ELISA yang telah disalut dengan jumlah optimal reseptor kolinergik, dicuci dengan dapar pencuci. Pada masing-masing lubang ditambahkan berturut-turut 100 μl α -kobatoksine atau derivatnya (N_ϵ -asetil-lisin-23) α -kobatoksine dengan konsentrasi yang bervariasi serta 100 μl ^3H - α -kobatoksine dengan radioaktivitas optimal seperti yang diperoleh pada percobaan di atas, kemudian diinkubasi pada temperatur kamar selama 4 jam (kondisi optimal). Setelah dicuci dengan dapar pencuci, pada masing-masing lubang ditambahkan 250 μl larutan NaOH 0,05M dan diinkubasi selama 2 jam pada temperatur kamar, selanjutnya dicacah menggunakan pencacah sintilasi cair dengan bantuan aqualuma.

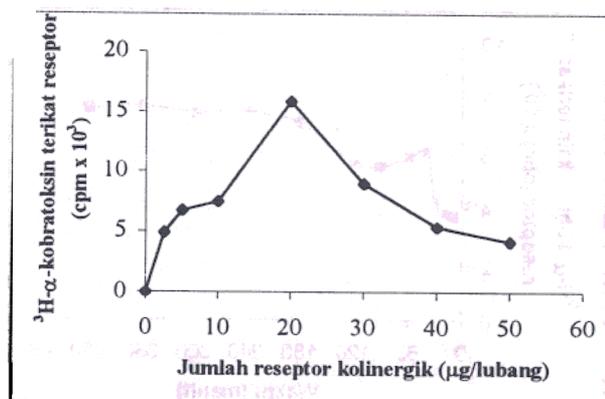
HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui gugus-gugus yang memegang peranan penting dalam aktivitas biologik suatu neurotoksin dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *radioassay* dengan teknik penyaringan menggunakan perunut radioaktif, *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan lain-lain berdasarkan suatu reaksi kompetisi antara neurotoksin yang dimodifikasi pada gugus tertentu dengan perunut yang digunakan terhadap reseptor kolinergik.

Dalam penelitian ini dikembangkan suatu metode dengan prinsip yang sama seperti *radioassay* tetapi menggunakan plat ELISA yang disalut dengan reseptor kolinergik sebagai media fase padat dimana penyalutan dilakukan dengan prinsip adsorpsi. Penambahan larutan NaOH pada lubang plat ELISA setelah reaksi selesai dimaksudkan untuk melepaskan hasil reaksi dari permukaan plat ELISA yang kemudian dicacah menggunakan sintilasi cair dengan bantuan aqualuma.

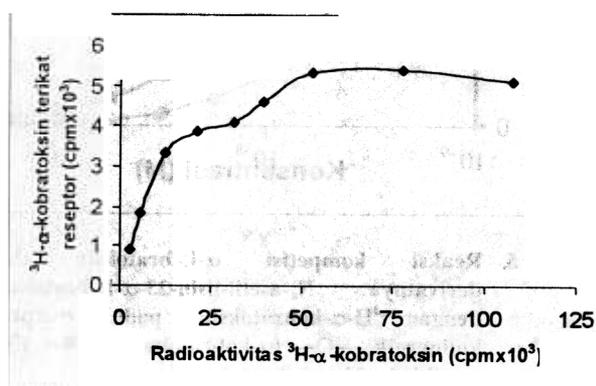
Jumlah reseptor kolinergik yang digunakan untuk menyalut permukaan lubang plat ELISA merupakan parameter penting dalam metode ini. Gambar 2 memperlihatkan hasil penentuan jumlah optimal reseptor kolinergik. Penggunaan sebanyak 20 μg per lubang plat ELISA memberikan fiksasi ^3H - α -kobatoksine yang maksimal, pemakaian dalam jumlah yang lebih kecil dan lebih besar dari jumlah tersebut memberikan fiksasi yang rendah. Dari hasil pengujian ini dapat dijelaskan bahwa pemakaian reseptor dengan jumlah yang lebih kecil dari 20 μg belum cukup untuk menyalut seluruh permukaan lubang plat ELISA.

Pada percobaan penentuan radioaktivitas optimal ^3H - α -kobatoksine, dapat diketahui jumlah optimal ^3H - α -kobatoksine yang terfiksasi pada reseptor kolinergik (radioaktivitas spesifik ^3H - α -kobatoksine 80 Ci/mmol atau 1 pmole = 64 10^3 cpm). Hasil percobaan penentuan radioaktivitas optimal ^3H - α -kobatoksine menggunakan reseptor kolinergik sebesar 20 μg ditampilkan pada Gambar 3. Penggunaan ^3H - α -kobatoksine dengan radioaktivitas antara 2,5 10^3 hingga 5,0 10^3 memberikan hasil yang terus meningkat di mana jumlah tersebut



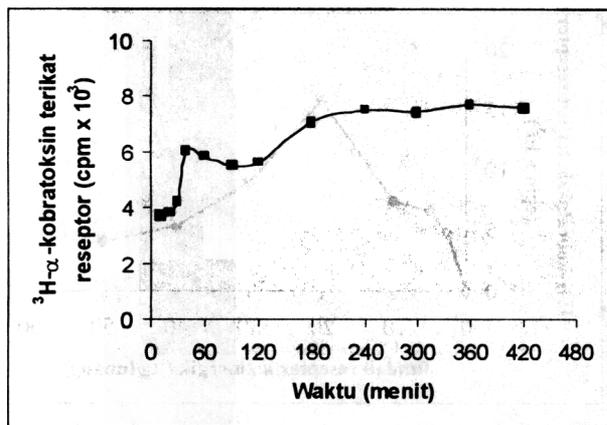
Gambar 2. Penentuan jumlah optimal reseptor kolinergik yang disalut pada lubang plat ELISA dalam reaksi fiksasi dengan ^3H - α -kobatoksine.

belum cukup untuk bereaksi dengan seluruh reseptor yang ada. Pemakaian ^3H - α -kobatoksine dengan radioaktivitas yang lebih tinggi memberikan hasil yang relatif konstan, karena jumlah tersebut melebihi jumlah reseptor kolinergik yang ada dimana kelebihan tersebut akan ikut terbuang pada tahap pencucian.

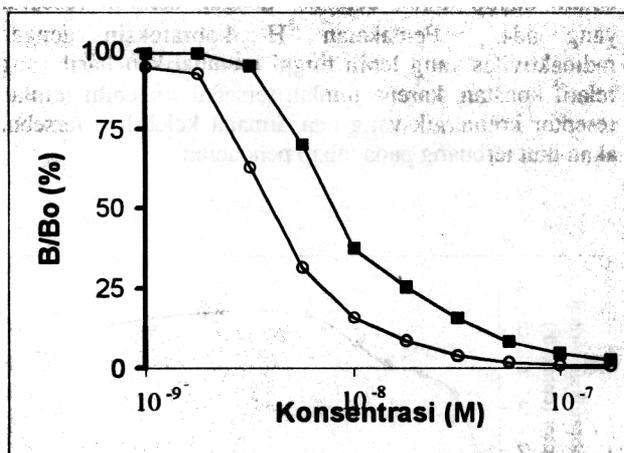


Gambar 3. Penentuan radioaktivitas optimal ^3H - α -kobatoksine dalam reaksi fiksasi terhadap reseptor kolinergik (20 μg) yang disalut pada lubang plat ELISA

Penentuan waktu inkubasi ^3H - α -kobatoksine terfiksasi pada reseptor kolinergik dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil percobaan menunjukkan bahwa radioaktivitas ^3H - α -kobatoksine yang optimal telah diperoleh dengan waktu inkubasi selama 4 jam, perpanjangan waktu inkubasi memberikan hasil yang relatif konstan. Hal ini berarti bahwa reaksi fiksasi ^3H - α -kobatoksine pada reseptor kolinergik telah sempurna pada waktu tersebut dimana semua reseptor yang disalut pada lubang plat ELISA telah bereaksi dengan ^3H - α -kobatoksine.



Gambar 4. Penentuan waktu inkubasi ³H-α-kobratoksin (7,5 10⁴ cpm) terfiksasi pada reseptor kolinergik (20 μg) yang disalut pada lubang plat ELISA.



Gambar 5. Reaksi kompetisi α-kobratoksin dan derivatnya N_ε-asetil-lisin-23-α-kobratoksin dengan ³H-α-kobratoksin pada reseptor kolinergik. -○- (α-kobratoksin), -■- (N_ε-asetil-lisin-23-α-kobratoksin)

Untuk mengetahui bahwa kondisi optimal yang diperoleh dari percobaan di atas dapat digunakan untuk menentukan gugus aktif α-kobratoksin, maka dilakukan reaksi kompetisi antara ³H-α-kobratoksin dan α-kobratoksin serta derivatnya dalam berbagai konsentrasi. Derivat α-kobratoksin yang digunakan adalah α-kobratoksin yang dimodifikasi secara kimia pada gugus lisin-23 dalam bentuk asetil yaitu N_ε-asetil-lisin-23-α-kobratoksin. Dari percobaan diperoleh bahwa harga IC₅₀ α-kobratoksin adalah sebesar 6,50 10⁻⁹ M dimana harga ini mendekati harga IC₅₀ α-kobratoksin yang diperoleh dari metode *radioassay* dengan teknik filtrasi atau penyaringan (IC₅₀ = 5,50 10⁻⁹ M) [5]. Percobaan menggunakan derivat N_ε-asetil-lisin-23-α-kobratoksin menunjukkan bahwa senyawa tersebut terinhibisi dalam reaksi fiksasi terhadap reseptor kolinergik (Gambar 5). Gugus lisin-23 dari α-kobratoksin merupakan gugus aktif yang berfungsi dalam reaksi fiksasi terhadap reseptor kolinergik [5]. Modifikasi kimia gugus amino tersebut

dapat mengubah struktur molekul α-kobratoksin sehingga akan mempengaruhi afinitasnya untuk terfiksasi pada reseptor kolinergik terlihat dengan meningkatnya harga IC₅₀ senyawa tersebut (9,50 10⁻⁹ M).

KESIMPULAN

Kondisi optimal metode *radioassay* teknik fase padat untuk α-kobratoksin dicapai pada penggunaan 20 μg reseptor kolinergik yang disalut pada lubang plat ELISA dengan radioaktivitas ³H-α-kobratoksin antara 5,0 10⁴ hingga 7,5 10⁴ cpm dan waktu inkubasi minimal 4 jam pada temperatur kamar.

Metode *radioassay* teknik fase padat dapat digunakan untuk menentukan afinitas gugus amino yang berperan dalam reaksi fiksasi pada reseptor kolinergik serta dapat digunakan untuk menentukan gugus aktif suatu toksin, yang berfungsi dalam aktivitas biologiknya untuk terfiksasi pada reseptor tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr.A.Menez, Kepala Laboratorium Service de Biochimie des Proteines - LIP, Centre d'Etudes Nucleaire, Commissariat L'Energie Atomique, Saclay, Perancis, atas izin yang diberikan untuk dapat bekerja pada laboratorium yang dipimpinnya. Ucapan terima kasih kami sampaikan pula kepada Dr.M.Leonetti yang telah banyak memberikan saran dan komentar sehingga terlaksananya penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- KARLSSON, E. Handbook of Experimental Pharmacology, ed. Lec, C.Y., Springer Verlag, Berlin, in Snake Venom, (1979), 52, 159-212.
- HUCHO, F. The Nicotinic Acetylcholine Receptor and It's Ion Channel, Eur. J. Biochem. 158, (1986) 211-226.
- LENTZ, T.L. and WILSON, P.T. Neurotoxin Binding site on the Acetylcholine Receptor, Int. Rev. Neurobiol. 29, (1988) 117-160.
- NILSON, B. YORCK, L. AKERSTROM, B. Enzyme Linked Immunosorbent Assay Using Alkaline Phosphatase Conjugated with Streptococcal Protein G., J. Immunoassay, 9 (2), (1988) 207-225.
- CHARPENTIER, I. Immunologie Moleculaire d'une Neurotoxine Longue Postsynaptique : l'α-kobratoksin de Venin de *Naja naja kaouthia*, These de Doctorat de L'Universite Rene Descartes de Paris, (1990) 28-32.
- VAN WEEMAN, B.K., SCHUURS, A.H.W.M. Immunoassay Using Antigen Enzyme Conjugates, FEBS Lett., 15, (1971) 232-236.

DISKUSI

SUDRADJAT ISKANDAR

1. Dalam menentukan gugus aktif suatu toksin, apakah selain metode radioassay teknik fase padat ada juga teknik fase cair ?
2. Bila ada bagaimana ditinjau dari teknik maupun biaya, apakah ada perbedaan dari kedua teknik tersebut ?

NURLAILA Z

1. Selain metode "radioassay" teknik fase padat, memang ada juga teknik fase cair dimana metode filtrasi merupakan teknik fase cair.
2. Bila ditinjau dari segi teknik pengerjaan teknik fase padat relatif lebih mudah karena tidak perlu dilakukan penyaringan satu persatu. Bila ditinjau dari segi biaya teknik fase padat relatif lebih murah karena untuk beberapa segi pengerjaan cukup digunakan, plat ELISA sedangkan bila metode filtrasi dipakai banyak tabung reaksi.

HENDIG WINARNO

Pada forsi mana tritium dilabelkan pada α -kobatoksine ?

NURLAILA Z

Tritium (^3H) dilabelkan pada gugus Histidin yang terdapat pada α -kobatoksine dengan 2 tahap :

1. Iodinasi dengan I^1Cl , α -kobatoksine + $\text{I}^1\text{Cl} \rightarrow \alpha$ -kobatoksine - I (pada gugus histidin)
2. Dehalogenasi katalitik dengan gas tritium aktif, α -kobatoksine - I + $^3\text{H} \rightarrow \alpha$ -kobatoksine - ^3H .