

## PENGARUH IRADIASI NEUTRON CEPAT TERHADAP LAJU TUMBUH, PRODUKTIVITAS DAN KANDUNGAN PROTEIN KHAMIR

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

\* Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional

\*\* Departemen Kimia - Institut Teknologi Bandung

### ABSTRAK

PENGARUH IRADIASI NEUTRON CEPAT TERHADAP LAJU TUMBUH, PRODUKTIVITAS DAN KANDUNGAN PROTEIN KHAMIR. Studi biologi molekular dengan menggunakan khamir sudah banyak dilakukan di luar negeri. Beberapa macam galur khamir *Saccharomyces cerevisiae* seperti *D4*, *D5* dan *D7* sudah banyak digunakan untuk uji karsinogenitas/mutagenitas. Pembuatan mutan baru yang peka terhadap karsinogen untuk jenis khamir yang ada di Indonesia, akan memungkinkan pengurangan risiko masyarakat terhadap penggunaan senyawa sintetis untuk pangan yang umum dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia. Usaha pembuatan mutan baru dari *S. cerevisiae* A3 ialah dengan mengiradiasi khamir tersebut dengan neutron cepat pada USIF reaktor Triga Mark II Bandung. Dosis iradiasi dibuat beberapa macam, dari 1000 - 5000 rad. Dugaan adanya mutasi dapat dipelajari melalui pola laju tumbuh, produktifitas/bobot kering dan kandungan protein sel khamir. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa laju tumbuh, hasil bobot kering mengalami penekanan sebanding dengan besarnya dosis iradiasi, sedangkan terhadap kandungan protein, tampaknya pengaruh yang ditunjukkan berbeda dengan kedua hal yang telah disebutkan terdahulu.

### ABSTRACT

THE INFLUENCE OF FAST NEUTRON IRRADIATION ON YEAST'S GROWTH RATE, PRODUCTIVITY AND PROTEIN CONTENT. Plenty of studies on molecular biology using yeasts have been carried out in developed countries. Some strains of *Saccharomyces cerevisiae* as *D4*, *D5* and *D7* have been used to test carcinogenic/mutagenic effect of some organic compounds. Development of new mutant of certain yeasts found in Indonesia which is sensitive to carcinogens/ mutagens, is hoped to be able in reducing cancerous risk in population that consumes synthetic materials, such as Indonesia. New mutant of *Saccharomyces cerevisiae* A3 was induced by irradiating the yeast in liquid medium with several doses of fast neutron, i.e. from 1000-5000 rads. Irradiation was done in the USIF of TRIGA MARK II reactor. The occurrence of mutation was determined by measuring the growth rate, productivity and protein content of yeast cells. The result shows that proportionally with irradiation doses, the growth rate and productivity of yeast cells were suppressed, and a different effect with the former was found in the protein content.

### PENDAHULUAN

Penelitian dengan menggunakan khamir di dalam bidang biologi molekular sudah banyak dilakukan di luar negeri, beberapa macam galur khamir *Saccharomyces cerevisiae* seperti *D4*, *D5* dan *D7* [1,2,3] sudah banyak digunakan untuk menguji mutagenitas/karsinogenitas senyawa-senyawa yang diduga mutagenik/karsinogenik. Dibandingkan dengan penggunaan sel mamalia, cara ini memberikan keuntungan khususnya dalam hal proses pelaksanaan uji.

Sejauh ini di Indonesia, studi mutasi terhadap sel khamir yang mengarah ke pembuatan mutan baru yang peka terhadap senyawa karsinogen/mutagen belum banyak dilakukan. Mengingat Indonesia adalah salah satu negara

yang cukup banyak mengkonsumsi bahan sintetis untuk keperluan sandang dan pangan, mutan khamir baru yang peka terhadap mutagen/karsinogen dapat mengurangi risiko gangguan kesehatan yang ditimbulkan oleh bahan sintetis yang bersifat karsinogenik/mutagenik.

Secara fisik, mutasi dapat ditimbulkan karena aksi sinar pengion atau neutron cepat. Dengan mengatur dosis iradiasi, diharapkan dapat mengubah sistem genetik tertentu dari khamir, sehingga dengan demikian dapat ditimbulkan suatu mutan baru yang diharapkan.

Perubahan sistem genetik khamir dapat dipelajari melalui beberapa kelainan sifat biokimiawinya. Di antaranya ialah laju

pertumbuhan, produktivitas/bobot kering dan kandungan protein dari sel mikroorganisme tersebut.

Hasil penelitian yang diperoleh ini diharapkan dapat menunjang khasanah ilmu pengetahuan, khususnya yang berkaitan dengan studi mutasi.

## BAHAN DAN TATA KERJA

### Bahan

Bahan kimia yang digunakan adalah dalam derajat analisis. Ragi yang digunakan ialah *Saccharomyces cerevisiae* A3 yang diperoleh dari laboratorium Biokimia ITB. Sebelum digunakan untuk penelitian ini, khamir tersebut diadaptasikan dulu dalam medium etanol 1 %.

### Tata kerja

#### Pembuatan media cair

##### Medium etanol 1%

Ditimbang sejumlah pepton, ekstrak khamir dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Campuran tersebut dilarutkan dalam sejumlah volume air hingga dicapai konsentrasi akhir untuk masing-masing komponen senyawa tersebut 1 % (b/v). Sebelum volume akhir medium dicapai, ditambahkan sejumlah etanol sehingga diperoleh konsentrasi akhir etanol 1 % (v/v). Selanjutnya medium ini disterilkan dengan otoklaf pada tekanan 15 psi dan suhu 121 °C selama 15 menit.

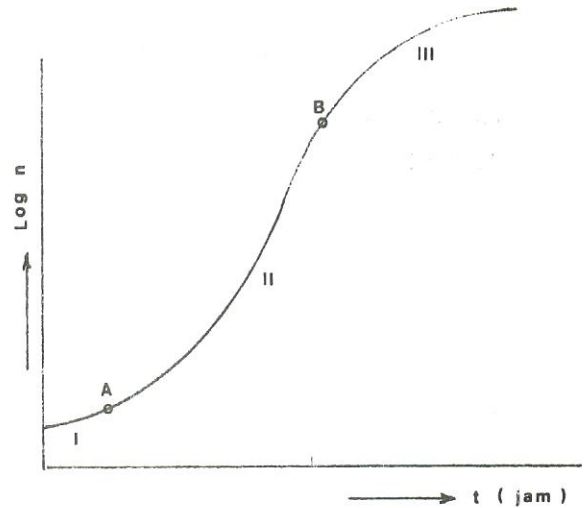
##### Medium glukosa 2%

Campuran pepton, ekstrak khamir dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sama seperti pada pembuatan media etanol 1 %. Di sini etanol diganti dengan glukosa (b/v). Selain itu, pada sterilisasi, campuran pepton, ekstrak khamir dan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dipisahkan dari larutan glukosa. Setelah selesai sterilisasi, kedua macam larutan tersebut dicampurkan secara aseptik agar tidak terjadi kontaminasi.

#### Iradiasi khamir *Saccharomyces cerevisiae* A3 dengan neutron cepat

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* A3 ditumbuhkan dalam medium etanol 1 %. Setelah dicapai fase eksponensial (lihat gambar di atas), diambil 6 buah cuplikan masing-masing 5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Selanjutnya tabung ditutup dengan kapas yang dibalut kain kasa agar tidak terjadi kontak dengan udara luar.

Cuplikan khamir ini diiradiasi dengan neutron cepat pada fasilitas USIF. Satu tabung cuplikan digunakan sebagai blanko dan tabung lainnya memperoleh dosis iradiasi masing-masing 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 rad. Dosis



Gambar. Kurva laju tumbuh ragi

- I. Fase adaptasi
- II. Fase eksponensial
- III. Fase stasioner

iradiasi ini merupakan dosis lanjutan dari dosis penjangjangan. Perlakuan ini diulang dua kali.

Selesai iradiasi, biakan khamir disentrifuga agar sel khamir mengendap. Setelah itu, disuspensikan kembali dalam 5 ml medium etanol 1 % baru. Hal ini dikerjakan dengan tujuan untuk mengurangi efek sampingan yang mungkin terjadi akibat radiolisis molekul air pada media biakan.

#### Penentuan laju tumbuh

Laju tumbuh sel khamir ditentukan secara turbidimetri dengan spektrofotometer merk Hitachi pada  $\lambda = 650 \text{ nm}$ . Fase pertumbuhan yang diamati ialah dari fase adaptasi sampai dengan fase stasioner. Waktu biak khamir ialah waktu yang diperlukan oleh populasi sel khamir untuk menjadi dua kali jumlah populasi sel semula [4]. Di dalam kurva pertumbuhan, waktu biak diukur pada daerah pertumbuhan eksponensial, yaitu dengan jalan menghitung waktu yang diperlukan oleh sel khamir dari suatu harga resapan cahaya ( $\text{OD}_1$ ) menjadi duakali harga resapan cahaya semula ( $\text{OD}_2$ ;  $\text{OD}_2 = 2 \times \text{OD}_1$ ; lihat gambar). Laju tumbuh khamir yang sudah diiradiasi dengan neutron cepat ini dipelajari pada dua macam media cair, yaitu media etanol 1 % dan glukosa 2 %.

Ragi yang sudah diiradiasi dengan berbagai dosis neutron cepat diinokulasikan ke dalam kedua macam media cair. Inokulasi dilakukan dalam ruang steril Laminar Air Flow Bench (LAFB) dan dilakukan secara aseptis. Biakan khamir dengan berbagai dosis iradiasi disertai dengan khamir yang tidak diiradiasi (blanko), dikocok dengan pengocok biakan mikroba merk



dikocok dengan pengocok biakan mikroba merk Edmun Buhler pada frekuensi 180 kocokan/menit. Pengukuran resapan cahaya untuk menentukan laju pertumbuhan, dilakukan dengan pengambilan beberapa cuplikan biakan pada fase adaptasi, fase eksponensial dan fase stasi- oner. Resapan cahaya dibaca dengan spektro- fotometer pada  $\lambda = 650$  nm. Waktu tumbuh ditentukan melalui kurva pertumbuhan setiap macam biakan.

Setelah dipanen, khamir disuspensikan dalam air suling. Ragi dalam suspensi ini dicuci 3 kali dengan air suling. Pencucian dilakukan secara sentrifugasi. Setelah itu sel khamir disuspensikan kembali ke dalam 7,5 ml bufer fosfat, pH 7,5. Penentuan bobot kering dilakukan dengan mengambil 1 ml cuplikan suspensi khamir dalam bufer fosfat dan dikeringkan di dalam oven selama 1 jam pada suhu 100 °C.

Sisa suspensi sel khamir digunakan untuk penentuan kandungan protein. Lisat khamir diperoleh dengan memecah sel khamir dengan sonikator pada intensitas 0,6 A selama 6 menit. Untuk mencegah kemungkinan denaturasi protein/enzim yang akan diteliti lebih lanjut maka suhu pada waktu memecah sel dibuat serendah mungkin yaitu dengan jalan membenamkan wadah suspensi dalam bongkahan es.

Lisat sel khamir diperoleh dengan sentrifuga homogenat khamir pada kecepatan 5000 rpm, selama 30 menit dan suhu 4 °C. Setelah itu ditentukan kandungan protein dari lisat sel khamir secara metode Lowry [5].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Waktu biak khamir blanko dan khamir yang sudah diiradiasi dengan berbagai dosis neutron cepat dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2, masing-masing untuk media etanol 1% dan glukosa 2%. Tabel 3 dan 4 menunjukkan bobot kering khamir di dalam kedua macam media cair, sedangkan Tabel 5 dan 6 menampilkan persen kandungan protein khamir dalam tiap ml suspensi khamir.

Dari hasil yang diperoleh tampak bahwa secara keseluruhan laju tumbuh khamir lebih cepat bila ditumbuhkan khamir lebih cepat bila ditumbuhkan di dalam media glukosa 2% daripada di dalam media etanol 1%. Pola pengaruh iradiasi neutron cepat terhadap laju tumbuh khamir di dalam kedua media tersebut di atas tampak sama, yaitu makin besar dosis iradiasi makin lama waktu biak khamir (lihat Tabel 1 dan 2).

Produktivitas/bobot kering khamir juga dipengaruhi oleh radiasi neutron cepat. Dosis

Tabel 1. Laju tumbuh khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium etanol 1 %

Jenis khamir	Waktu biak	% terhadap normal	+/- (%)
	$\bar{X} \pm S.K.$		
Normal	128 ± 2,25		
1000 R	141 ± 1,73	110	+ 10
2000 R	137 ± 5,25	107	+ 7
3000 R	146 ± 1,56	114	+ 14
4000 R	150 ± 4,02	117	+ 17
5000 R	179 ± 3,18	140	+ 40

Catatan :

$\bar{X}$  = harga rata-rata waktu biak

S.K. = standar kesalahan

1000 R = khamir yang diiradiasi dengan dosis 1000 rad

2000 R = khamir yang diiradiasi dengan dosis 2000 rad dan seterusnya.

Tabel 2. Laju tumbuh khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium glukosa 2 %

Jenis khamir	Waktu biak	% terhadap normal	+/- (%)
	$\bar{X} \pm S.K.$		
Normal	68 ± 2,27		
1000 R	67 ± 4,15	106	+ 10
2000 R	77 ± 3,00	122	+ 7
3000 R	85 ± 6,58	135	+ 14
4000 R	91 ± 4,98	144	+ 17
5000 R	96 ± 3,00	152	+ 40

Catatan :

Lihat catatan Tabel 1.

5000 rad menekan produktivitas khamir relatif nyata dari pada dosis sebelumnya (Tabel 3 dan 4).

Pola penekanan terhadap bobot kering tidak sama seperti yang terlihat pada penekanan terhadap laju tumbuh sel khamir. Intensitas penekanan radiasi neutron cepat terhadap laju tumbuh sel khamir yang dibiakkan di dalam media etanol 1% dan glukosa 2% lebih kurang sama, sedangkan pada produktivitas khamir tampaknya penekanan yang terjadi relatif lebih nyata pada sel khamir yang dibiakkan dalam medium etanol 1%.

Selanjutnya dalam hal kandungan protein (Tabel 5 dan 6), pola pengaruh radiasi neutron



Tabel 3. Bobot kering khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium etanol 1%

Jenis khamir	Bobot kering/ml ( $\mu\text{g}$ )	% terhadap normal
normal	$29,52 \times 10^3$	
1000 R	$23,68 \times 10^3$	80
2000 R	$22,99 \times 10^3$	78
3000 R	$24,09 \times 10^3$	82
4000 R	$24,17 \times 10^3$	82
5000 R	$20,71 \times 10^3$	70

Catatan :  
normal = khamir yang tidak diiradiasi  
1000 R = khamir yang diiradiasi dengan dosis 1000 rad  
2000 R = khamir yang diiradiasi dengan dosis 200 rad dan seterusnya

Tabel 4. Bobot kering khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium glukosa 2%

Jenis khamir	Bobot kering/ml ( $\mu\text{g}$ )	% terhadap normal
normal	$30,35 \times 10^3$	
1000 R	$29,11 \times 10^3$	96
2000 R	$28,96 \times 10^3$	95
3000 R	$29,36 \times 10^3$	97
4000 R	$27,82 \times 10^3$	92
5000 R	$27,49 \times 10^3$	91

Catatan :  
Lihat catatan Tabel 3.

mena sebelumnya. Di sini justru makin tinggi dosis iradiasi neutron cepat, makin besar pula kandungan protein sel khamir. Pada dosis 5000 rad, kandungan protein khamir etanol mencapai satu setengah kali lipat dan khamir glukosa hampir dua kali lipat dari khamir blanko masing-masing.

Kedua kelompok fenomena biokimiawi yang berlawanan yang terjadi akibat iradiasi neutron cepat terhadap sel khamir *S. cerevisiae* A3 ini, sungguh menarik. Mungkinkah iradiasi pada dosis 5000 rad ini sudah mampu menimbulkan mutan baru? Untuk dapat membuk-

Tabel 5. Kandungan protein sel khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium etanol 1%

Jenis khamir	Kandungan protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	% terhadap bobot kering	% terhadap normal
normal	1488	5,0	
1000 R	1278	5,4	108
2000 R	1439	6,3	126
3000 R	1344	5,3	106
4000 R	1350	5,6	112
5000 R	1621	7,8	158

Catatan :  
Lihat catatan Tabel 3.

Tabel 5. Kandungan protein sel khamir normal dan khamir yang diiradiasi neutron cepat dalam medium glukosa 2%

Jenis khamir	Kandungan protein ( $\mu\text{g/ml}$ )	% terhadap bobot kering	% terhadap normal
normal	1373	4,5	
1000 R	1278	4,4	98
2000 R	2064	7,1	158
3000 R	1393	4,7	104
4000 R	1262	4,5	100
5000 R	2657	9,7	246

Catatan :  
Lihat catatan Tabel 3.

tiken hal tersebut, perlu dilakukan penentuan lebih lanjut beberapa sifat biokimiawi lainnya dari *S. cerevisiae* A3.

## KESIMPULAN

Iradiasi neutron cepat dengan dosis 1000-5000 rad

1. Menghambat laju tumbuh dan menekan produktivitas *S. cerevisiae* A3. Penghambatan/penekanan sebanding dengan dosis iradiasi,
2. Cenderung meningkatkan kandungan protein, terutama pada dosis iradiasi 5000 rad.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Saudari Rina Stefania, mahasiswa dari Akademi Kimia Analisis Bogor yang telah membantu banyak di dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Callen, D.F. and Philpot, R.M., Cytochrome P450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation Research, 45 (1977) 309 - 324
2. Cellen, D.F., Roland Wolf and Philpot, R. M., Cytochrome P450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*, Mutation Research, 77 (1980) 55 - 63
3. Eckardt, F., Muliawan, H., N de Ruiter and Kappus, H., "Rat hepatic vinyl chloride metabolites induce gene conversion in the yeast strain D7RAD in vitro and in vivo", Mutation Research, 91 (1981) 381 - 390
4. Brock, T.D., Biology of Microorganisms, 3<sup>rd</sup> ed., Prentice/Hall International Editions, (1979) 211-218.
5. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., Protein measurement with Folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193 (1951), 265 - 275.

## DISKUSI

### Gunanjar :

1. Kalau kita lihat, penggunaan iradiasi neutron cepat kurang menguntungkan dibanding dengan iradiasi dengan sinar  $\gamma$ , karena iradiasi neutron cepat terjadi pula reaksi (n, $\gamma$ ) walau dengan tampang serapan rendah, sedang  $\gamma$  (untuk  $E_\gamma < 2$  MEV) tidak terjadi reaksi inti, iradiasi neutron cepat perlu fasilitas reaktor nuklir dengan operator khusus dan dengan prosedur operasi yang ketat, sedang iradiasi dengan sinar  $\gamma$  tidak demikian. Keuntungan/keunggulan apa sehingga ibu memilih iradiasi dengan neutron cepat ?
2. Pada penelitian ini diperoleh bahwa makin besar dosis yang diberikan, kandungan protein lebih tinggi. Mohon bisa dijelaskan kenaikan protein ini berasal dari mana ?

### Nurhayati T. :

1. Keunggulan/keuntungan yang dipertimbangkan :
  - sasaran iradiasi dengan neutron cepat ialah inti sel organisme
  - di PPTN tidak tersedia radiator  $\gamma$ ; tetapi reaktor nuklir
  - media biakan yang digunakan ialah media cair, iradiasi dengan neutron cepat tidak menimbulkan radiolisis air pada media biakan
2. Peningkatan kandungan protein diduga karena adanya miskonsepsi dari DNA misalnya duplikasi gen yang berperan dalam sintesis protein.

### M. Yanis Musdja :

1. Apakah telah dapat dikonversikan dari dosis penyinaran penelitian ini khamir telah mati sama sekali ?
2. Bagaimana caranya dari penelitian ini dapat diketahui bahwa khamir yang terbentuk bersifat karsinogenik/mutasigenik ?

### Nurhayati T. :

1. Secara analogi, khamir akan mati pada dosis iradiasi neutron cepat tertentu. Dalam rancangan penelitian kami, hal tersebut tidak dicakup.
2. Mutan yang diinginkan adalah yang peka terhadap prokarsinogen/promutagen, bukan khamir yang karsinogenik/mutagenik.

### Irwan :

1. Apa dicoba dengan dosis dibawah 1KR ?
2. Kemampuan khamir yang diduga mutan dalam masalah fermentasi ?

### Nurhayati T. :

1. Dilakukan, observasi hanya pada laju tumbuh saja.
2. Akan dipelajari dari aspek enzimatisnya ( menyusul ).

**H. I. Komala :**

Lalu kalau sudah ditemukan mutan baru dari khamir, apa hubungannya dengan pernyataan memungkinkan pengurangan resiko masyarakat terhadap penggunaan senyawa sintetis untuk pangan. Pernyataan ini tidak diterangkan dalam pembicaraan.

**Nurhayati T. :**

Dengan mutan tersebut dapat diuji/diseleksi secara cepat dan tepat senyawa sintetis untuk pangan yang bersifat karsinogen/mutagen. Dengan demikian maka penggunaan zat/senyawa tersebut dapat dihentikan dari peredaran sedini mungkin.