

## PENYEBARAN BENZO( $\alpha$ )PIREN- $^{14}$ C DALAM KOMPONEN SEL/MOLEKUL SEL KHAMIR

Nurhajati T\*, P. Soedigdo\*\*, S. Soedigdo\*\*  
\* Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Badan Tenaga Atom Nasional  
\*\* Pusat Antar Universitas - Institut Teknologi Bandung

### ABSTRAK

PENYEBARAN BENZO( $\alpha$ )PIREN- $^{14}$ C DALAM KOMPONEN SEL/MOLEKUL SEL KHAMIR. Sejauh ini, masalah mekanisme karsinogenesis kimiawi belum ada pemecahan secara tuntas. Uji karsinogenitas yang dilakukan oleh Ames dan kawan-kawan telah mengimbas pemakaian beberapa galur khamir *S.cerevisiae* sebagai indikator untuk uji karsinogenitas/mutagenitas senyawa hidrokarbon poliiinti. Telah dibuktikan bahwa khamir *S.cerevisiae* A3 menyerap (uptake) BP (BP- $^{14}$ C). Penentuan penyebaran BP di dalam komponen sel atau makromolekul sel khamir dapat digunakan untuk menjelaskan sifat kerja BP dalam mekanisme karsinogenesis. Bahan yang digunakan di dalam penelitian ini ialah khamir *S. cerevisiae* A3 yang telah teradaptasi tumbuh dalam media etanol 1%, BP diperoleh dari Fluka, BP- $^{14}$ C diperoleh dari Amersham dan bahan untuk media, umumnya diperoleh dari Difco, kecuali etanol absolut dari E.Merck dan cairan pemendar (scintillation cocktail) dari Packard. Penyebaran BP(BP- $^{14}$ C) di dalam komponen sel dan makromolekul (DNA) masing-masing dipelajari dengan metode sentrifugasi gradien sukrosa dan metode Potter dan kawan-kawan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa BP- $^{14}$ C yang diserap, menyebar di dalam sitoplasma dan sebagian dapat menembus masuk ke alam inti sel khamir. Di dalam sitoplasma keradioaktifan yang berasal dari BP- $^{14}$ C ditemukan kembali pada filtrat dan komponen sel yang mengendap pada gradien molaritas sukrosa 1,5 M; 1,8 M dan 2,0 M. Di dalam inti sel, keradioaktifan ditemukan kembali pada homogenat inti sel khamir, sedangkan pada isolat DNA tidak terdeteksi.

### ABSTRACT

THE DISTRIBUTION OF  $^{14}$ C-BENZO( $\alpha$ )PYRENE IN CELLULAR AND MOLECULAR COMPONENT OF YEAST. The clarification in the process of carcinogenesis is still obscured. The test for carcinogens done by Ames et.al. had induced in using some strains of yeast (*S. cerevisiae*) as the indicators in the test of some polynuclear hydrocarbons. Supposed to be carcinogens or mutagens. In the former experiment it was found that *S. cerevisiae* A3 could uptake BP( $^{14}$ C-BP). By determining the local distribution of BP in cell components and macromolecules, the mode of action of BP in the carcinogenesis could be explained. The materials used under the present experiment were as follow: *S. cerevisiae* A3, BP (Fluka),  $^{14}$ C-BP (Amersham), materials for media (Difco), absolute ethanol (E. Merck) and scintillation cocktail (Packard). Sucrose gradient centrifugation and method of DNA isolation by Potter et.al. were used respectively to study BP( $^{14}$ C-BP) distribution in the cell components and macromolecules (DNA). The results obtained shows that the absorbed  $^{14}$ C-BP distributes in the cytoplasm and part of it can penetrate into the nucleus. The radioactivity in the cytoplasm was recovered both in the filtrate and precipitate (cell components) in the sucrose molarity gradient of 1.5 M; 1.8 M and 2.0 M. In the nucleus, the radioactivity was detected in nuclear homogenate, but not in DNA isolate.

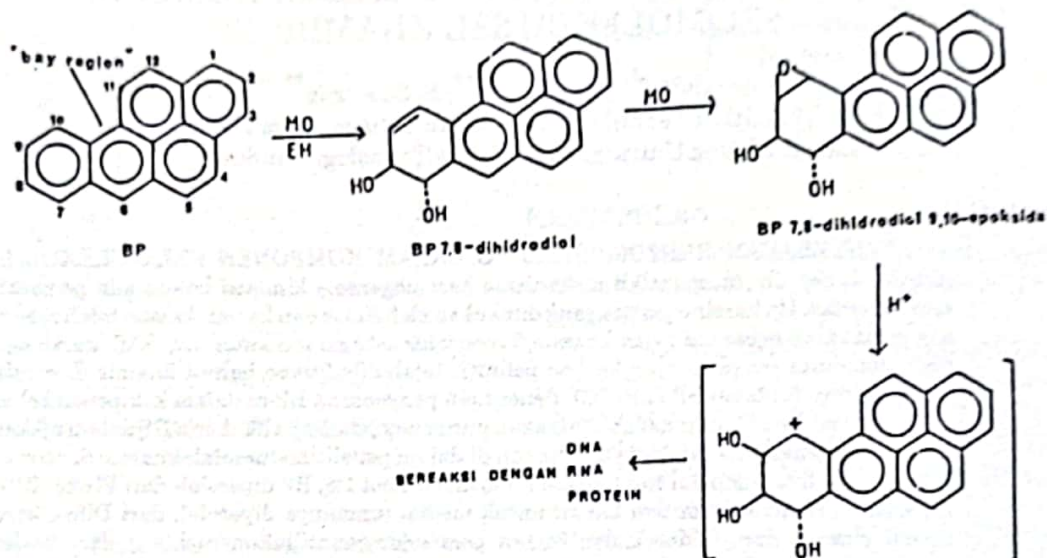
### PENDAHULUAN

Benzo( $\alpha$ )piren (BP) merupakan bakal karsinogen poten pada mamalia, 50  $\mu$ g BP sudah dapat menimbulkan tumor atau kanker pada tikus dengan bobot tubuh 150 g [1]. Di alam BP banyak ditemukan sebagai hasil pembakaran materi organik yang tidak sempurna (seperti pada asap rokok, asap mobil, daging panggang antara lain sate) [2].

Sejauh ini penelitian mengenai pengaruh fisiologik BP umumnya dilakukan pada jaringan mamalia. Zat tersebut akan diubah menjadi karsinogen aktif (ultimate carcinogen), bila masuk ke dalam sel organisme. Perubahan tersebut dapat terjadi karena kerja sitokrom P<sub>450</sub> yang terdapat pada mitosom hati [3]. Telah dikemukakan di dalam beberapa penelitian ter-

dahulu mengenai mekanisme perubahan BP di dalam sel organisme dapat dilihat pada Gambar 1 [4,5].

khamir *S. cerevisiae* A3 yang dibiakkan di Laboratorium Biokimia Institut Teknologi Bandung mampu menyerap BP bertanda  $^{14}\text{C}$



Gambar 1. Perubahan BP oleh enzim mikrosom hati

Setelah berikatan dengan DNA, karsinogen ini mengubah pola replikasi makromolekul tersebut. Dengan demikian timbullah sel terubah (transformed cell) yang selanjutnya bisa menjadi sel kanker.

Penemuan mekanisme karsinogenesis ini mengundang Ames dan kawan-kawan mengembangkan suatu uji yang penting untuk menentukan karsinogenitas berbagai macam senyawa kimia [6]. Cara uji ini sangat menguntungkan karena selain hasil uji dapat diperoleh dalam waktu yang sangat singkat, juga biaya uji yang sangat murah bila dibandingkan dengan biaya uji pada sel mamalia [7]. Namun demikian ada beberapa kelemahan dijumpai pada hasil uji ini, karena Ames dan kawan-kawan menggunakan prokariot (bakteri *Salmonella typhimurium*). Kelemahan yang ada itu berusaha ditopang oleh peneliti lain dengan menggunakan eukariot sel tunggal yaitu khamir (*S. cerevisiae*). Zimmerman, Callen dan kawan-kawan [8, 9] menggunakan khamir *S. cerevisiae* galur D3, D4 dan D5 yang ditumbuhkan dalam media glukosa 2%, ternyata menghasilkan sitokrom  $\text{P}_{450}$ , untuk uji karsinogenitas dan mutagenitas. Sasaran uji yang dipelajari ialah morfologi koloni dan sitogenetik.

Pada penelitian sebelumnya Tanudjojo dan kawan-kawan [10] telah membuktikan bahwa

(BP- $^{14}\text{C}$ ). Dengan mempelajari penyebaran BP di dalam komponen sel atau molekul sel khamir diharapkan dapat digunakan untuk menjelaskan sifat kerja BP yang berkaitan dengan mekanisme karsinogenesis di dalam sel organisme tersebut.

#### BAHAN DAN TATA KERJA

Bahan yang digunakan ialah khamir *S. cerevisiae* A3 yang dibiakkan di Laboratorium Biokimia Institut Teknologi Bandung dan telah dialihbiakkan di dalam media etanol 1%. Di dalam media ini, organel sel khamir tumbuh lebih lengkap daripada sel khamir yang ditumbuhkan di dalam media glukosa 2%, begitu pula dengan macam sitokrom yang dihasilkan lebih lengkap. Karsinogen BP dan BP- $^{14}\text{C}$  (sebagai perunut) masing-masing diperoleh dari Fluka dan Amersham. Bahan untuk media umumnya diperoleh dari Difco, kecuali etanol absolut dan beberapa bahan kimia lainnya diperoleh dari E. Merck.

BP yang akan ditambahkan di dalam media perbenihan dilarutkan di dalam etanol absolut dengan kadar 0,01%, sedangkan BP- $^{14}\text{C}$  ( $^{14}\text{C}$  pada atom C 7 dan 10) yang digunakan sebagai perunut dilarutkan di dalam toluen.

Penyebaran BP (BP- $^{14}\text{C}$ ) di dalam sel khamir dipelajari menurut metode sentrifugasi gra-

dien sukrosa dan isolasi DNA dengan metode Potter dan kawan-kawan [12, 13].

Tahapan kerja dilakukan sebagai berikut:

#### Isolasi inti sel khamir

Sel khamir etanol (N) dan sel khamir yang dikenakan (BP) dengan konsentrasi akhir 0,001% dipanen pada fase eksponensial. Setelah dicuci 3 kali secara sentrifugasi (2-4°C) dengan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1%, untuk khamir BP dibilas dengan etanol 70% untuk membersihkan sisa BP yang melekat pada dinding sel.

Selanjutnya, sejumlah  $\pm 0,2$  g (bobot kering) khamir disuspensikan dalam 10 ml sukrosa 1 M dan ditambahkan  $\pm 1,5$  ml getah pencernaan bekicot (*Achalina fulica* Fer.). Kemudian campuran ini diperam pada suhu 30°C, selama 1 - 2 jam, sambil diaduk sering-sering secara hati-hati. Setelah itu, protoplas dipisahkan secara sentrifugasi pada suhu 2 - 4°C, kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Protoplas yang didapat dicuci secara sentrifugasi dengan sukrosa 1 M, pada kecepatan 4000 rpm selama 10 menit. Protoplas yang didapat dicuci secara sentrifugasi dengan sukrosa 1 M, pada kecepatan 4000 rpm dan suhu 2 - 4°C. Pencucian dilakukan 3 kali.

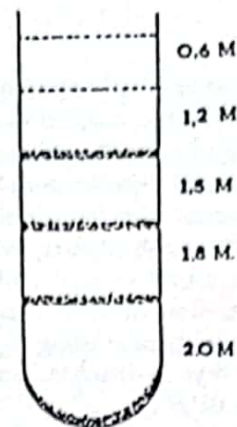
Suspensi protoplas khamir yang diperoleh dihomogenisasikan dalam Elvehjem Potter selama 10 menit dengan kecepatan kira-kira 500 rpm, pada suhu dingin ( $\pm 4^\circ\text{C}$ ). Setelah itu dilakukan *osmotic shock* dengan mengencerkan suspensi protoplas dengan air sehingga konsentrasinya berubah mendadak dari 1 M menjadi 0,25 M, protoplas pecah dan membebaskan inti sel khamir.

Inti sel yang bebas ini dipisahkan dari fragmen sel lainnya dan sel khamir yang masih utuh dengan cara *density gradient centrifugation* yaitu sentrifugasi dalam tabung yang berisi lapisan sukrosa yang berbeda-beda molaritasnya, antara 0,6 - 2,0 M.

Campuran inti khamir disuspensikan dalam 4 ml sukrosa 0,6 M. Ke dalam tabung sentrifuga yang panjangnya 10 cm dan diameternya 2,5 cm diisi secara perlahan dengan larutan sukrosa berturut-turut dari bawah ke atas seperti pada Gambar 2.

Suspensi campuran inti khamir dituangkan dengan hati-hati ke dalam tabung, pada lapisan gradien sukrosa paling atas. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2800 rpm selama 60 menit pada suhu 2°C.

Setelah selesai disentrifugasi, tampak adanya endapan pada tiap permukaan lapisan gra-



Gambar 2. Lapisan sukrosa dengan gradien molaritas

dien sukrosa. Masing-masing lapisan ini ditarik dengan pipet perlahan-lahan dan selanjutnya diperiksa di bawah mikroskop. Inti sel khamir akan terdapat pada lapisan yang paling bawah, yaitu pada dasar tabung sentrifuga.

#### Isolasi DNA Khamir

Inti sel khamir disuspensikan dalam 10 ml EDTA 0,05 M (pH 8,5), ditambahkan 1 ml lisozim (10 mg/ml). Selanjutnya diperam pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah itu ditambahkan 1 ml SDS 25%, diperam kembali pada suhu 70°C selama 15 menit. Kemudian didinginkan di atas es dan ditambahkan 2 ml natrium asetat 5 M dingin, dicampur perlahan-lahan dan dibiarkan di atas es selama 60 menit.

Selanjutnya campuran disentrifuga selama 10 menit pada 8000 rpm, supernatan dipindahkan ke tabung sentrifuga yang baru dan ditambahkan etanol dingin 2 kali volum dan diaduk perlahan-lahan, disentrifugasi lagi selama 10 menit, lalu endapan disuspensikan dengan dapar Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 7,5) sebanyak 4 ml. Setelah 3 jam pada suhu kamar, diekstraksi dengan kloroform: fenol (1:1) sebanyak 3 kali untuk memisahkan protein residu. Yang terakhir, dilakukan lagi presipitasi dengan etanol, lalu disentrifugasi 10 menit pada 13000 rpm. Endapan dikeringkan, lalu disuspensikan lagi dalam 150  $\mu\text{l}$  dapar Tris-HCl, 1 ml EDTA (pH 7,5), maka diperoleh larutan campuran RNA-DNA. Untuk memisahkan DNA dari RNA dilakukan elektroforesis dengan agarose.

Selanjutnya untuk mengetahui ada tidaknya ikatan BP (BP- $^{14}\text{C}$ ) ke molekul DNA khamir, dilakukan otoradiografi dan pencacahan keradioaktifan dengan pencacah sintilasi cair.

#### Fraksi inti dan fraksi sel

Pada proses isolasi DNA, endapan yang ada setelah larutan DNA dipisahkan adalah

fraksi inti, kemudian ditentukan keradioaktifannya.

Caranya adalah sebagai berikut: sejumlah kecil fraksi inti ini dipindahkan ke bagian pusat sebuah kertas aluminium (aluminium foil) berbentuk bulat, dibuat lapis tipis. Dibiarkan mengering pada suhu kamar, ditentukan bobotnya dan akhirnya dicacah dengan pencacah Geiger Muller. Sebagai pembanding digunakan fraksi inti sel khamir yang ditumbuhkan dalam media etanol tanpa BP-<sup>14</sup>C.

Fraksi sel yang dimaksud di dalam penelitian ini ialah endapan yang terdapat pada gradien larutan sukrosa yang digunakan (0,6; 1,2; 1,5; 1,8; dan 2,0 M). Endapan diperoleh pada kekentalan 1,5; 1,8; dan 2,0 M. Selanjutnya ditentukan keradioaktifan endapan dan filtrat yang diperoleh ini.

Sebanyak 0,5 ml filtrat dari gradien sukrosa 1,5; 1,8; dan 2,0 M dituangkan ke dalam botol cacah pencacah sintilasi cair, ditambahkan 9,5 ml cairan pemendar (liquid scintillation: Insta-Gel, Packard, Cat. No. 6002177) dan dikocok agar bercampur rata. Setelah itu campuran dicacah dengan pencacah sintilasi cair. Setiap cuplikan dicacah selama 15 menit dan diulang dua kali. Sebagai pembanding digunakan larutan media yang ditambahkan BP-<sup>14</sup>C dengan kondisi yang sama seperti yang digunakan untuk menumbuhkan khamir.

Untuk endapan yang ada, ditentukan keradioaktifannya sama seperti waktu menentukan keradioaktifan fraksi inti.

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Keradioaktifan yang ditemukan pada fraksi sel dari sel khamir dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Keradioaktifan pada fraksi sel khamir dari sel khamir

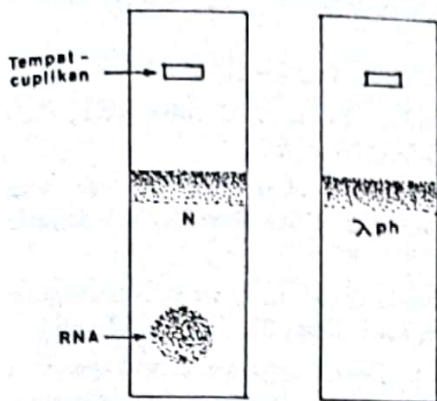
Molaritas sukrosa	Keradioaktifan (% terhadap standar)	
	Filtrat	Endapan
1,5 M	4,32	-
1,8 M	7,87	6,78
2,0 M	4,90	3,47

Hasil pencacahan yang didapat dari fraksi inti ialah 52781 cpm/g dan 124 cpm/g masing-masing untuk fraksi inti sel khamir yang dibenihkan di dalam media yang mengandung BP (BP-<sup>14</sup>C) dan media normal.

DNA khamir yang diisolasi dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4. Gambar 3 menunjukkan bahwa pita yang tampak pada elektroforegram isolat khamir etanol (N) memperlihatkan harga Rf yang sama dengan isolat DNA lamda phage, (DNA standar) dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pita tersebut adalah DNA khamir. Gambar 4 menunjukkan pita DNA khamir N dan khamir BP (BP-<sup>14</sup>C). Rf kedua macam DNA tersebut tampak tidak berbeda. Hasil otoradiografi elektroforegram khamir yang dikenakan BP(BP-<sup>14</sup>C), untuk mengetahui keterikatan BP(BP-<sup>14</sup>C) pada DNA khamir, negatif. Selanjutnya dari hasil pemeriksaan dengan pencacah sintilasi cair menunjukkan bahwa aktifitas BP-<sup>14</sup>C yang terkandung dalam substansi DNA lebih kurang hanya 0,5% (lihat Tabel 4). Dari kedua hal yang diperoleh itu, tampaknya BP (BP-<sup>14</sup>C) tidak membentuk ikatan dengan DNA khamir.

Mengamati keradioaktifan yang ditemukan kembali di dalam fraksi sel, dapat dijelaskan sebagai berikut: bahwa pada sentrifugasi dengan gradien molaritas sukrosa, makin besar bobot suatu molekul, maka makin besar pula daya lintasannya di dalam larutan gradien sukrosa. Melalui cara ini, campuran yang terdiri atas berbagai macam partikel atau molekul dalam suatu suspensi atau larutan dapat dipisahkan dalam gradien molaritas sukrosa yang berbeda. Di dalam sitoplasma, terlarut bermacam-macam protein dengan bobot molekul berbeda, mRNA dan terdapat berbagai macam organel. Protein dengan bobot molekul besar mampu melintas ke molaritas larutan sukrosa yang tinggi (1,5; 1,8; dan 2,0 M). Protein tersebut berikatan dengan BP-<sup>14</sup>C, sehingga dengan

demikian ditemukan keradioaktifan pada molaritas larutan sukrosa tersebut di atas. Selanjutnya mengenai keradioaktifan yang ditemukan pada endapan pada larutan sukrosa 1,8 dan 2,0 M diduga karena adanya pengikatan

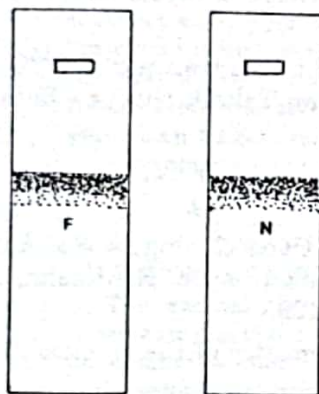


Gambar 3. Elektroforegram DNA

Keterangan:

N = DNA khamir etanol;

λ-ph = DNA λ phage etanol



Gambar 4. Elektroforegram DNA

Keterangan:

N = DNA khamir etanol

F = DNA khamir BP(<sup>14</sup>C-BP)

atau penempelan BP.<sup>14</sup>C oleh atau pada organel atau debris dinding atau inti sel khamir.

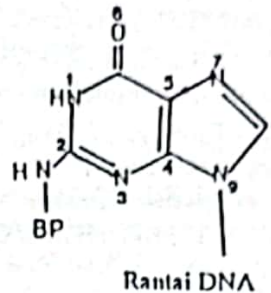
Melihat hasil cacah inti sel khamir BP(BP-<sup>14</sup>C) dan fraksi inti sel khamir N yang berbeda nyata, membuktikan bahwa BP yang diserap sel khamir mampu menembus membran inti dan selanjutnya mampu berikatan dengan komponen inti sel.

Mengenai pola interaksi antara BP dan DNA inti telah diungkapkan pada beberapa pus-

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Fisbein, L., Flamm, W.G., and Falk, H.L., Chemical Mutagens, Academic Press, Inc., New York (1970), 45.

taka. Di antaranya [14] ada yang menjelaskan secara teoritis, bahwa setelah mengalami aktivasi, BP berikatan dengan gugus amino C-2 dari molekul guanin (lihat Gambar 5), setelah itu menyisip di antara dua untai (dupleks) DNA. Penyisipan juga dapat terjadi tanpa aktivasi.



Gambar 5. Ikatan derivat BP dengan gugus amino

Pada eksperimen ini, ikatan BP dan DNA tidak dapat diwujudkan. Hal ini mungkin disebabkan karena ikatan yang terbentuk itu lemah, sehingga dengan berbagai perlakuan pada proses isolasi DNA inti sel khamir, ikatan BP-<sup>14</sup>C-DNA akan lepas kembali. Dengan demikian tidak ditemukan kembali keradioaktifan yang berasal dari perunut BP-<sup>14</sup>C pada isolat DNA.

#### KESIMPULAN

Melalui hasil percobaan yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa setelah menembus dinding dan membran sel khamir, BP sebagian menyebar di dalam sitoplasma dan berikatan dengan komponen sitoplasma (protein, organel sel dan lainnya) dan sebagian menembus lebih lanjut ke inti sel serta berikatan dengan komponen inti sel, kecuali DNA.

#### SARAN

Wawasan dan intensifikasi penelitian ini masih perlu dikembangkan lagi, agar identifikasi komponen yang berikatan dengan BP dan perilaku BP baik di dalam sitoplasma maupun inti sel khamir terungkap lebih jelas.

2. Devoret, R., Bacterial test for potential carcinogens, *Scientific American*, 241, No.2 (1971) 28 - 37.
3. Rudon, R. W., *Cancer Biology*, Oxford University Press, New York, Oxford (1981) 211 - 254.
4. Phillips, D.H., *Chemical Carcinogenesis*, dalam *The Molecular Basic of Cancer*, (Ed., P.B. Farmer and Walker, J.M.), Cromm Helm Ltd., London, Sydney (1985) 136.
5. Okano, P., Whitlock, J.P., dan Gelboin, H.V., Aryl hydrocarbon hydroxylase and benzo(a)pyrene metabolism in rodent liver and human cells, *Annals of the New York Academic of Science*, 349 (1980) 232 - 246.
6. Ames, B. N., Mc Cann, J., dan Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella/mammalian - microsome mutagenicity test*, *Mut. Res.*, 31 (1975) 347 - 364.
7. Ames, B. N., Durston, N. W., Yamasaki, E., and Lee, F. D., Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 70 (1973) 2281 - 2285.
8. Zimmerman, F. K., *Detection of Genetically Active Chemicals Using Various Yeast System*, in: *A terms Hollaender, Chemicals Mutagens: Principles and Methods for Their Detection*, Vol 3, Plenum, New York (1973) 209 - 239.
9. Callen, D. F., Wolf C. R., dan Philpot, R. M., Cytochroms P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutation Research*, 77 (1980) 55 - 63.
10. Tanudjojo, N., Soedigdo, P., dan Soedigdo S., Studi pendahuluan transpor BP-<sup>14</sup>C melalui membran sel ragi, disajikan pada kolokium Pusat Penelitian Teknik Nuklir - Batan, Bandung, Juli (1989).
11. Finean, J. B., Coleman, R., dan Michell, R.H., *Membrane and Their Cellular Function*, 3<sup>rd</sup> ed., Blackwell Scientific Publication, Oxford, London, Melbourne (1984).
12. Potter, A.A., Nasim, A., Zitomer, R.S., Hollenberg, P.C., *Gene cloning in Saccharomyces cerevisiae*, dalam *Recombinant DNA Methodology* (Ed. Dillon, J. A. R., Nasim, A., dan Nestman, E. R.), John Wiley & Sons, New York (1985) 127 - 129.
13. Adams, R. L. P., Knowler, J. T., Leader, D. P., *The Biochemistry of the Nucleic Acid*, 10<sup>th</sup> Ed., Chapman and Hall, London, New York (1986) 218 - 219.