

VALIDASI METODE *FLOODING DOSE* UNTUK MENGUKUR LAJU SINTESIS PROTEIN PADA SEL CACO-2

Ulyarti

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Jambi

ABSTRAK

Metode *flooding dose* adalah salah satu teknik yang digunakan untuk mengukur laju sintesis protein. Metode ini menggunakan asam amino yang diberi label radioaktif bersamaan dengan asam amino yang tidak berlabel radioaktif dalam jumlah yang besar. Penelitian ini dilakukan untuk memvalidasi metode *flooding dose* yang digunakan untuk mengukur laju sintesis protein pada sel Caco-2. Penelitian ini berhasil menunjukkan tercapainya ekuilibrium antara aktifitas spesifik phenylalanine bebas intraseluler pada sel Caco-2 dan aktifitas spesifik phenylalanine bebas ekstraseluler pada media untuk menumbuhkan sel Caco-2. Pencapaian ekuilibrium ini adalah validasi metode *flooding dose* untuk mengukur laju sintesis protein pada sel Caco-2.

Kata kunci: *flooding dose*, laju sintesis protein, Caco-2

ABSTRACT

Flooding dose method is one technique that usually used for measuring protein synthesis rate. This method uses labelled amino acid together with large amount of unlabelled amino acid. This experiment was done to validate the flooding dose method used in measuring protein synthesis rate in Caco-2 cells. The results showed that there were equilibrium between intracellular free phenylalanine and extracellular free phenylalanine in media used to grow Caco-2 cells. This is a validation of the flooding method used in measuring protein synthesis rate in Caco-2 cells.

Keywords: flooding dose, protien synthesis rate, Caco-2

PENDAHULUAN

Laju sintesis protein dapat ditentukan dengan mengukur laju pengikatan asam amino yang telah diberi label radioaktif kedalam protein. Pengukuran laju sintesis protein rata-rata memerlukan pengukuran aktifitas spesifik asam amino yang telah terikat pada protein dan aktifitas spesifik asam amino bebas yang bertindak sebagai prekursor dan terdapat pada lokasi sintesis protein. Aktifitas spesifik (*specific activity*) adalah kuantifikasi jumlah radioaktif yang dalam penelitian ini aktifitas spesifik adalah kuantifikasi asam amino yang berlabel radioaktif.

Pengukuran aktifitas spesifik asam amino yang terikat pada protein dapat dilakukan dalam 2 tahap yaitu hidrolisis protein untuk melepaskan asam amino yang terikat dan diikuti dengan pengukuran aktifitas spesifik asam amino hasil hidrolisis. Pengukuran aktifitas spesifik asam amino bebas yang bertindak sebagai precursor sintesis protein dapat dilakukan dengan mengukur aminoacyl t-RNA, namun pengukuran precursor ini sulit dilakukan karena precursor ini terdapat dalam jumlah yang sangat kecil sehingga sulit terdeteksi.^{1,2)} Selain itu, aminoacyl t-RNA mengalami

turn-over yang tinggi sehingga diperlukan waktu yang sangat singkat untuk mengukur jumlahnya.

Kesulitan ini kemudian diatasi dengan menggunakan asam amino bebas didalam sel (intraseluler) atau asam amino bebas didalam plasma (ekstraseluler) sebagai acuan prekursor sintesis protein. Metode ini hanya dapat dilakukan dengan asumsi bahwa aktifitas spesifik prekursor-prekursor ini berada dalam keadaan ekuilibrium dengan aktifitas spesifik aminoacyl t-RNA.

Pencapaian ekuilibrium antara precursor yang diukur dengan precursor yang sebenarnya dilakukan dengan menggunakan dua metoda yaitu *constant infusion* dan *flooding dose*. Metode *constant infusion* menggunakan asam amino dengan konsentrasi yang rendah namun dilakukan dalam waktu yang cukup lama (infuse hingga 6 jam). Metode *flooding dose* menggunakan asam amino dengan konsentrasi yang tinggi namun dilakukan dalam waktu yang singkat (kurang lebih 10 menit). Masing-masing metode dapat digunakan dalam pengukuran laju sintesis protein untuk sampel yang sesuai³. Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memvalidasi metode *flooding dose* dalam pengukuran laju sintesis protein pada sel Caco-2. Metode ini dinyatakan dapat digunakan untuk mengukur laju sintesis protein apabila terbentuk ekuilibrium antara asam amino bebas intraseluler dengan asam amino bebas ekstraseluler.

METODE

Bahan

Zat kimia untuk menumbuhkan kultur sel, lisis, pengukuran aktifitas spesifik asam amino dan pengukuran protein dibeli dari *Sigma Chemicals*. Zat kimia untuk menumbuhkan kultur sel terdiri dari Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin, Fetal Bovine Serum (FBS), penicillin dan glutamin. Protease inhibitor, sodium duodecyl sulphate (SDS), dan Phosphate Buffer Saline (PBS) digunakan untuk lisis. PBS dibuat pada pH 7.4. Buffer untuk lisis sel dibuat dengan komposisi PBS : protease inhibitor cocktail : SDS 10% sama dengan 100 : 1 : 1.

Zat kimia untuk mengukur aktifitas spesifik asam amino bebas terdiri dari phenylethylamine (20 μ M), L-tyrosine decarboxylase (1.4 unit/ml), sodium citrate (0.5M, pH 6.3), pyridoxal phosphate (0.5mg/ml enzyme suspension), d,l-leucylalanine (2mM), phenylalanine (15mM), NaOH (3M), H₂SO₄ (0.01M), chloroform, campuran chloroform dan n-heptana dengan proporsi 1 : 3, K₂HPO₄ (1.5M, pH 8.0), dan ninhydrin.

Suspensi enzim 1.4 unit/ml dibuat dengan mengencerkan L-tyrosine decarboxylase powder menggunakan sodium citrate (0.5M pH 6.3) dan penambahan 0.5 mg/ml pyridoxal phosphate. Reagen untuk pengukuran fluorimetric phenylethylamine adalah larutan ninhydrin yang terdiri dari 210

ml K_2HPO_4 (1.5M, pH 8.0), 30 ml d,l-leucylalanine (2mM), dan 0.55 g ninhydrin.

Untuk pengukuran protein digunakan perchloric acid, tripotassium citrate (jenuh), NaOH (0.3M), Bovine Serum Albumin (BSA, 0.5mg/ml), lysis buffer (PBS : protease inhibitor cocktail : SDS 10% = 100 : 1 : 1), Bradford reagent (20%), dan HCl (0.01M). Perchloric acid 5% digunakan untuk presipitasi protein dan 2% larutan ini digunakan untuk mencuci protein.

Amino acid berlabel yang digunakan adalah L-phenylalanine [ring-2,4³H]. Zat ini dibeli dari Vitrex radiochemicals. Radioactive ini memiliki aktifitas spesifik 35 Ci/mol.

Kultur Sel

Sel Caco-2 ditumbuhkan pada T25 plastics flasks pada suhu 37°C menggunakan DMEM media yang mengandung 10% Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penicillin, dan 2.5 mM glutamin. Untuk eksperimen sebanyak 200.000 sel ditumbuhkan pada masing-masing 6 buah T25 flask yang telah diisi 4 ml media. Media untuk kultur disegarkan setiap dua hari sekali selama 7 hari.

Pada hari pelaksanaan eksperimen, semua sel di pre-inkubasi selama 2 jam dengan media DMEM yang bebas serum. Keenam buah flasks kemudian diinkubasi dengan DMEM media yang mengandung 10% Fetal Bovine Serum, 100 U/ml penicillin, dan 2.5 mM glutamine selama 24

jam pada suhu 37°C. Pada akhir masa inkubasi, media disegarkan dengan menggunakan 4 ml media yang sama dengan penambahan 15 mM phenylalanine dan 10µl phenylalanine yang telah diberi label (aktifitas spesifik sama dengan 35 Ci/mmol) dengan total radioaktivitas 5 µCi didalam flask dengan aktifitas spesifik kurang lebih 0.083 Ci/mmol. Inkubasi dalam media radioaktif dilakukan selama beberapa waktu hingga maksimum 4 jam.

Selama masa 4 jam inkubasi ini, 3 aliquots sebanyak masing-masing 20 µl media dipipet dan ditransfer kedalam tabung eppendorf. Media dipipet setelah diinkubasi selama 0, 15, 30, 60, 120, and 240 menit. Media kemudian dibekukan pada -20°C sampai dilakukan pengukuran aktifitas spesifik asam amino bebas ekstraseluler.

Pada akhir masa inkubasi semua media kemudian dipipet, sel kemudian dicuci menggunakan 1 ml PBS sebanyak dua kali dan langsung dilakukan lisis untuk ekstraksi protein dan pengukuran aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler.

Analisis aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler

Sel pada dasar flask diambil kemudian dilisis menggunakan 1.5 ml lysis buffer. Lisis dilakukan dengan menghancurkan sel menggunakan *glass rod* selama 15 detik diikuti dengan inkubasi didalam *ice bath* selama 10 menit. Setelah

lisis homogenate kemudian disentrifus pada 13.000 rpm selama 5 menit. Kedalam supernatant supernatant ditambahkan 1.5 ml 5% (w/v) HClO₄ dingin dan disentrifus pada 2800 rpm selama 15 menit untuk mempresipitasi protein. Protein ini kemudian digunakan untuk pengukuran kadar protein. Supernatant yang mengandung phenylalanine dimasukkan kedalam 1.5 ml tripotassium citrate jenuh untuk mengendapkan potassium perchlorate dan disentrifus pada 2800 rpm selama 15 menit. Supernatant ini digunakan untuk pengukuran aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler.

Prinsip pengukuran aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler adalah dengan mengukur hasil konversi fenilalanin menjadi phenylethylamine (PEA) melalui konversi enzimatik menggunakan L-tyrosine decarboxylase. Konsentrasi PEA dilakukan dengan menggunakan fluorimetric assays pada 390 nm – 495 nm. Standar yang digunakan berkisar antara 0 ml sampai 1 ml PEA 20 µM yang dibuat dengan menggunakan H₂SO₄ 0.01 M.

Aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler ($S_{a-intra}$) dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$S_{a-intra} = \frac{\text{phenylalanine counts (dpm)}}{\text{phenylalanine (nmol)}}$$

Analisis aktifitas spesifik fenilalanin bebas ekstraseluler

Analisis aktifitas spesifik fenilalanin bebas ekstraseluler dilakukan dengan menggunakan metode Garlick et al (1980). Metode yang digunakan sama dengan fenilalanin bebas intraseluler dengan perbedaan pada volume larutan organic yang digunakan untuk ekstraksi PEA dalam H₂SO₄. Volume untuk ekstraksi fenilalanin bebas ekstraseluler adalah 5 ml sedangkan pada fenilalanin bebas intraseluler adalah 8 ml.

Aktifitas spesifik fenilalanin bebas ekstraseluler ($S_{a-extra}$) dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$S_{a-extra} = \frac{\text{phenylalanine counts (dpm)}}{\text{phenylalanine (nmol)}}$$

Analisis aktifitas spesifik fenilalanin yang terikat pada protein

Endapan protein dicuci dengan menggunakan 5 ml perchloric acid 2% hingga asamnya memiliki radioactivity counts yang rendah. Sampel kemudian diresuspensi dalam 1 ml 0.3 M NaOH. Sebanyak 200 µl larutan ini kemudian digunakan untuk *liquid scintillation counting* dan 200 µl lagi digunakan untuk pengukuran konsentrasi protein menggunakan metode Bradford. Standard yang digunakan adalah 0 hingga 200 µl BSA 0.5 mg/ml. Lysis buffer digunakan untuk membuat larutan standard. Konsentrasi fenilalanin yang terikat pada protein dihitung dengan menggunakan asumsi 2.76% (w/w) kadar phenylalanine

didalam protein (McCance and Widdowson, 1980). Aktifitas spesifik fenilalanin yang terikat pada protein (S_b) dihitung sbb:

$$S_b = \frac{\text{radioactive counts untuk fenilalanin yang terikat pada protein (dpm)}}{\text{Fenilalanin yang terikat pada protein (nmol)}}$$

Radioactive counting

Radioactive counting dilakukan menggunakan Beckman LS 6500 Multi-purpose scintillation counter. Sebanyak 10 ml *scintillation fluid* (Ecoscint A LS-273) ditempatkan dalam *scintillation vial* bersama dengan media yang akan diukur aktifitas spesifiknya. Pada eksperimen ini digunakan sebanyak 1 ml larutan sampel fenilalanin bebas intracellular dan ekstraseluler dan 200 μ l untuk sampel fenilalanin yang terikat pada protein.

Perhitungan laju sintesis protein

Laju sintesis protein (FSR) pada sel dihitung dengan menggunakan rumus dibawah ini:

$$\text{FSR (\%/day)} = \frac{(S_{b2} - S_{b1})}{\bar{S}_a} \times \frac{24}{t_2 - t_1} \times 100$$

Dimana:

S_{b1} adalah aktifitas spesifik fenilalanin yang terikat pada protein pada t_1

S_{b2} adalah aktifitas spesifik phenylalanine yang terikat pada protein pada t_2

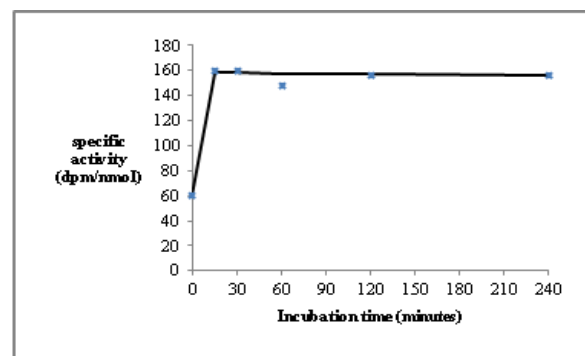
\bar{S}_a adalah rata-rata aktifitas spesifik fenilalanin bebas intracellular ($S_{a-intra}$) or extracellular ($S_{a-extra}$) dari t_1 hingga t_2 .

t_1 dan t_2 adalah waktu inkubasi (dalam jam)

PEMBAHASAN

1. Prekursor Intraseluler dan Ekstraseluler

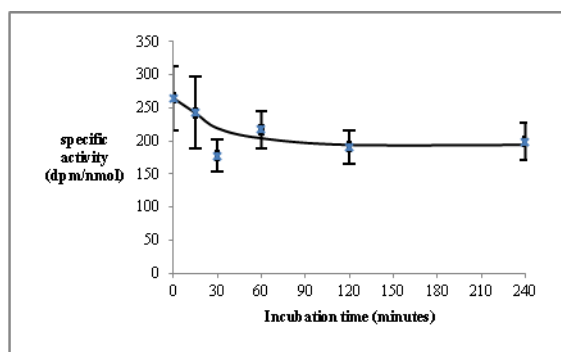
Aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler mencapai nilai maksimum segera setelah proses flooding pada kultur Caco-2 dengan [ring2,4³H]phenylalanine. Setelah 15 menit, aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler stabil hingga 4 jam masa inkubasi (Gambar 1). Hasil ini menunjukkan bahwa proses flooding fenilalanin didalam sel telah berhasil dicapai. Dengan dicapainya kestabilan aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler selama inkubasi, pengukuran laju sintesis protein dapat dilakukan dengan menggunakan prekursor ini.



Gambar 1. Perubahan aktifitas spesifik fenilalanin bebas intraseluler pada sel Caco-2 setelah flooding dengan [ring2,4³H]phenylalanine.

Perubahan aktifitas spesifik fenilalanin bebas ekstraseluler pada sel Caco-2 mencapai kestabilan segera setelah proses flooding

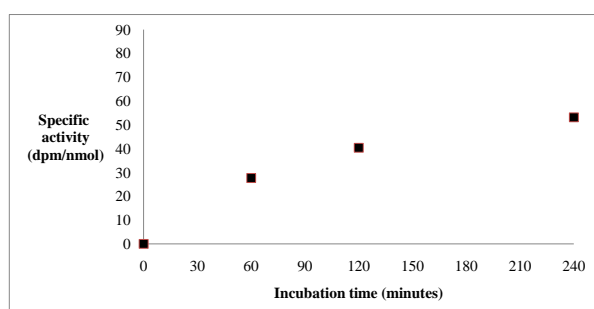
dengan [ring2,4³H]phenylalanine (Gambar 2).



Gambar 2. Time course of the change in specific activity of extracellular free phenylalanine in Caco-2 cells grown in control medium; values were means \pm SD, n=3.

2. Laju Sintesis Protein

Seperti yang diharapkan, terjadi peningkatan aktifitas spesifik fenilalanin yang terikat pada protein. Gambar 3 menampilkan pola inkorporasi fenilalanin kedalam protein yang meningkat namun non linier. Ini menunjukkan bahwa terjadi proses sintesis protein yang berasal dari precursor baik itu intraseluler maupun ekstraseluler.



Gambar 3. Aktifitas spesifik fenilalanin yang terikat pada protein pada sel Caco-2 setelah flooding dengan [ring2,4³H]phenylalanine.

Dari perhitungan dengan menggunakan precursor intraseluler, sel Caco-2 memiliki laju sintesis protein sebesar

333 %/hari sedangkan perhitungan dengan menggunakan precursor ekstraseluler sel Caco-2 memiliki laju sintesis protein sebesar 262 %/hari. Laju sintesis protein tertinggi dicapai pada awal inkubasi dan menurun selama masa 4 jam flooding dengan [ring2,4³H]phenylalanine.

Nilai ini sangat tinggi bila dibandingkan dengan hasil yang didapat oleh Le Bacquer yang menggunakan sel yang sama namun menggunakan asam amino leucine dan metode *trace dose*.⁴⁾ Pengaruh flooding dose terhadap ketersediaan fenilalanin untuk sintesis protein tidak dapat digunakan untuk menjawab fenomena ini karena tingginya jumlah fenilalanin yang digunakan dalam metode *flooding dose* tidak menstimulasi laju sintesis.⁵⁾ Perbedaan jenis asam amino yang digunakan sebagai acuan prekursor sintesis protein mungkin merupakan salah satu penjelasan tentang perbedaan nilai laju sintesis protein yang didapat dalam penelitian ini.

KESIMPULAN

Metode flooding dose dapat digunakan untuk mengukur laju sintesis protein pada sel Caco-2, yaitu dengan dicapainya ekuilibrium antara aktifitas spesifik precursor fenilalanin bebas intraseluler dan ekstraseluler. Pengukuran laju sintesis protein yang dihitung selama 4 jam menunjukkan bahwa laju

sintesis protein sel Caco-2 sebesar 262% - 333% per hari.

DAFTAR PUSTAKA

1. McNurlen, M., Tomkins, A. & Garlick, P., **1979**, The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochemistry*, 373-379.
2. Davis, T., Fiorotto, M., Nguyen, H. & Burrin, D., **1999**, Aminoacyl-tRNA and tissue free amino acid pools are equilibrated after a flooding dose of phenylalanine. *American Journal of Physiol Endocrinol Metab*, 103-109.
3. Coeffier, M. *et al.*, **2003**, Enteral Glutamine Stimulates Protein Synthesis and Decreases Ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *American Journal of Physiol Gastrointest Liver*, 266-273.
4. Bacquer, L., Laboisse, C. & Darmaun, D., **2003**, Glutamine preserve protein synthesis and paracellular permeability in Caco-2 cells submitted to "luminal fasting". *American Journal of Physiol Gastrointest Liver*, 128-136.
5. Caso, G. *et al.*, **2006**, The increase in human muscle protein synthesis induced by food intake is similar when assessed with constant infusion and flooding technique. *Journal of Nutrition* 6, 1504-1510.