

Alberta Pratiwi

KARAKTERISTIK MOLEKULER PROTEIN YANG MENGKATALISI...

Sources Overview

12%

OVERALL SIMILARITY

1

adoc.pub

INTERNET

8%

2

123dok.com

INTERNET

3%

3

blog.unika.ac.id

INTERNET

<1%

4

ejournal19.com

INTERNET

<1%

5

id.scribd.com

INTERNET

<1%

Excluded search repositories:

None

Excluded from document:

Bibliography

Quotes

Citations

Small Matches (less than 8 words)

Excluded sources:

None

ISBN 978-602-98902-1-1

KARAKTERISTIK MOLEKULER PROTEIN YANG MENINGKATKAN BIOSINTESIS SILIKA DARI DIATOM LAUT *Chaetoceros gracilis*

[The Molecular Characteristic of Protein that Catalyze Silica Biosynthesis from Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*]

Alberta Rika Pratiwi^{1*}, Maggy Thenawidjaya Suhartono², Dahrul Syah², Linawati Hardjito³

1. Departemen Teknologi Pangan, Universitas Katolik Soegijapranata-Semarang

2. Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas IPB-Bogor

3. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB-Bogor

ABSTRACT

*In the food industry, silica is used as a filtering agent, ultra filtration membrane component of the beverage industry, element of bio-nanosensor, composite active packaging materials and others. Methods of silica production are always under extreme condition but in the nature, Diatom produced very high nano silica (90 % of the cell wall) under mild condition. Silica structure of diatom is genetically controlled by a protein silaffin. Protein Silaffin has been successfully used as a polymerization catalyst nanosilika at room temperature within several minutes by in vitro. By understanding the various molecules involved in formation of biosilica in vivo and in vitro will open a new understanding in the design process of the formation of nanosilika. The aim of this research was to study of characteristic of protein that catalyzes nanosilica biosynthesis with electrophoresis 2D analysis. These methods included isolation of protein silaffin and 2D analysis with Melanie 7 program for bioinformatics study. Concentration of protein silaffin of *Chaetoceros gracilis* is very small (femto scale). Result of protein analysis by 2D was found 5 fraction of silaffin protein: silaffin 1 (MW 43.49 kDa, pI 7.78), silaffin 2 (MW 47.56 kDa, pI 5.97), silaffin 3 (MW 70.36 kDa, pI 4.30), silaffin 4 (MW 72.32 kDa, pI 4.29), silaffin 5 (MW 11.04, pI 6.97).*

Key words : *Chaetoceros gracilis*, Silica, Protein silaffin. Electrophoresis 2D,

PENDAHULUAN

Nanosilika adalah material silika berskala nano yang akhir-akhir ini menjadi bahan penting untuk berbagai alat. Pada bidang pangan nanosilika dimanfaatkan antara lain sebagai *filtering agent*, *bionanosensor* dan *active packaging*. Silika merupakan polimer tersusun dalam tiga dimensi dan silikon dioksida (SiO₂) yang banyak ditemukan di alam. Silika memiliki sifat tidak berwarna, tidak berasa dan secara fisiologi bersifat inert, tahan terhadap reaksi kimia pada temperatur biasa tetapi dapat mengalami berbagai transformasi pada temperatur tinggi. Karakteristik demikian menyebabkan banyaknya aplikasi berbasis silika.

Metode-metode yang digunakan untuk memperoleh silika (polimer) dengan kemurnian tinggi atau silikon (unsur silika) yang diaplikasikan di industri saat ini, pada umumnya menggunakan kondisi ekstrim seperti temperatur, tekanan dan prekursor toksik. Misalnya *ultrapure polycrystalline silicon* dan *silicon carbide* sebagai bahan semikonduktor diperoleh dengan meleburkan *quartz* pada tungku temperatur tinggi hingga ribuan derajat celsius (Maeda & Komatsu 1996; Rhicardson, 2001). Kondisi ekstrim yang juga melibatkan bahan kimia berbahaya, menjadi evaluasi mendasar dalam industri silika akhir-akhir ini.

Sementara, di alam terdapat organisme salah satu keluarga mikroalga yakni diatom yang menghasilkan silika dalam kondisi ringan. Karakteristik diatom adalah memiliki silika sekitar 90% sebagai komponen dinding selnya dengan struktur teratur berskala nano dan menyimpan cadangan makanannya berupa lipid (Round, et al., 1990). Kedua bahan tersebut diproduksi oleh diatom melalui suatu mekanisme sintesis yang melibatkan biokatalis protein tertentu.

Protein yang berperan dalam proses silifikasi diatom telah diketahui, yakni *silicic acid transport protein* (protein SIT), yang berperan membawa asam silikat dari lingkungannya melewati *lipid bilayer* masuk ke dalam *silica deposition vesicle* (SDV) dan protein silaffin (*silica affinity*) yang berperan dalam polimerisasi asam silikat menjadi nanosilika di dalam SDV. Protein-protein tersebut telah diketahui mengatur biosilifikasi secara *in vivo* dalam sistem metabolisme pada kondisi lingkungan alam yang ringan. Kroger et al. (2002) telah melakukan reaksi *in vitro* protein silaffin diatom *Chilindrotheca fuciformis* dengan substrat *Tetraethoxy-orthosilicate* untuk menghasilkan polimer nanosilika dalam beberapa menit pada temperatur ruang. Sementara Manurung et al. (2007) juga telah berhasil mengekstraksi protein silaffin dari diatom *Chaetoceros gracilis* dan mereaksikan secara *in vitro* dengan TEOS menghasilkan polimer silika dalam waktu 10 menit pada suhu ruang (26-28°C).

Studi mempelajari protein yang terlibat dalam biosilifikasi *in vivo* akan membuka pemahaman baru dalam mendesain proses pembentukan material berbasis silika secara ramah lingkungan.

*Korespondensi penulis : 08568076720

E-mail rika_pratiwi@yahoo.co.id

Menurut Poulsen & Kroger (2004), sekuen asam amino protein silaffin yang *diisolasi* dari dua jenis diatom yang berbeda tidak saling memiliki homologi, sehingga setiap jenis diatom diduga memiliki karakteristik protein silaffin yang khusus sesuai dengan karakteristik struktur nanosilika yang dimiliki. Dengan demikian masih diperlukannya informasi protein-protein yang terlibat dalam biosintesis silika dari spesies-spesies diatom spesifik, misalnya dari laut tropis seperti perairan wilayah Indonesia. Hal ini bertujuan untuk menghasilkan polimer nanosilika spesifik yang dapat diaplikasikan untuk sefiap kebutuhan secara khusus.

1 *Chaetoceros gracilis* adalah salah satu jenis diatom yang banyak ditemukan di perairan Indonesia, teknik kultur mudah dilakukan, bukan merupakan jenis mikroalga toksik serta belum banyak kajian dari aspek molekuler untuk mempelajari nanosilika.

Berdasarkan latar belakang yang disampaikan, maka tujuan umum dari penelitian ini adalah mengkaji protein yang terlibat dalam biosintesis nanosilika dari diatom laut *C. gracilis* asal Indonesia. Secara lebih terperinci penelitian ini bertujuan mempelajari karakteristik (berat molekul dan titik isoelektrik) protein melalui analisis 2 dimensi dan studi bioinformatika untuk identifikasi protein yang terlibat dalam biosintesis nanosilika.

METODOLOGI

2 Bahan dan alat

Diatome *Chaetoceros gracilis* merupakan organisme yang menjadi objek penelitian studi protein, diperoleh sebagai kultur mumi dari Pusat Penelitian dan Pengkajian Oceanologi-LIPI yang diambil dari perairan Teluk Jakarta Indonesia. Medium kultur modifikasi f12 Guillard meliputi makronutrien (NaNO_3 , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$), mikronutrien ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan Na_2EDTA), dan vitamin (B1, B12, biotin) serta *trace metal* ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.6 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Perangkat kultur sistem *batch* dilengkapi dengan sumber cahaya, pengatur waktu dan aerator.

1 Ekstraksi protein silaffin menggunakan kemikalia yang meliputi Tris-HCl pH 6.8 SDS, EDTA, aseton, HF, NH_4F . Pengukuran kadar protein menggunakan metode Bradford dengan pelarut yang terdiri dari etanol, asam fosfat, *Serve Blue G*. Analisis 2 dimensi yang terdiri dari preparasi protein, elektroforesis 1-Dimensi dan 2 dimensi menggunakan Tris-HCl pH 7.5, MgCl_2 , KCl, EDTA, PMSF, Triton X-100, TCA; urea, Triton X-100, p-merkaptotanol, ampholine pH 3-10. SDS, Tris-HCl pH 8.8, gliserol, DTT, iodoasetamida. Pewarnaan hasil 2 dimensi menggunakan pewarnaan *Coomassie blue* yang mengandung *Coomassie blue* R-250, metanol dan asam asetat glasial.

Alat yang digunakan untuk analisis protein adalah spektrofotometer, Protean IEF-Biorad, Mini *Elektrophoresis* SIDS-PAGE-Biorad. Hasil elektroforesis 2 dimensi dipindai menggunakan *High Resolution Scanner* — *Image Scanner* (Amersham Pharmacia Biotech).

Karakterisasi protein dilakukan menggunakan perangkat lunak Melanie 7.0 sedangkan identifikasi protein menggunakan program TagIdent.

Ekstraksi Protein Silaffin

Metode ekstraksi protein silaffin berdasarkan metode Kroger *et al.*, (1999). Pelet sel diatom *Chaetoceros gracilis* diekstrak dengan 2% SIDS/ 3.7% EDTA lalu dididihkan selama 15 menit. Endapan

yang diperoleh *dicuci* 2 kali dengan air bebas ion, dilanjutkan dengan aseton 2 kali dan diulang kembali dengan air bebas ion.

2 Setelah proses pencucian kemudian dikeringudarkan dan dilarutkan ke dalam bufer 2 M HF dalam 8M NH_4F (pH 5) pada

suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan proses *desalting* dengan kolom HiTrap desalting 5 ml.

Analisis Kadar Protein

Pengukuran kadar protein menggunakan metode Bradford dengan *Bovine Serum Albumin* (BSA) sebagai standar. Sebanyak 100 μl filtrat protein direaksikan dengan 2 ml larutan Bradford diinkubasi sekitar 5 menit lalu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada r., 595 nm. Selanjutnya konsentrasi protein ditentukan berdasarkan *kurva* standar protein BSA (Bollag & Edelstein, 1991).

2 Analisis 2 dimensi

Analisis 2 dimensi dilakukan untuk memperoleh informasi protein yang dimiliki berdasarkan perkiraan berat molekul dan titik isoelektrik. Dengan menggunakan metode ini, protein dipisahkan sesuai dalam dimensi pertama (titik isoelektrik/ P1) dan berat molekul di dimensi ke dua (Phillips & Bogoy, 2005). Ada tiga tahap yang dilakukan dalam analisis 2D, yakni tahap 1 dimensi, tahap ekuilibrasi dan tahap 2 dimensi/

Tahap satu dimensi untuk memisahkan protein berdasarkan titik isoelektriknya. Pertama-tama adalah merehidrasi gel *strip*. Gel yang digunakan adalah *Ready Strip IPG Strips* 7 cm pH 3-10. Protein sampel dilarutkan dalam bufer rehidrasi yang dimodifikasi, mengandung 9.5 M urea, 2% Triton X-100, 5% p-merkaptotanol dan 5% ampholine pH 3-10. Protein dalam bufer diinjeksikan pada gel, didiamkan 1 jam, ditutup *mineral oil* lalu diinkubasi di *rehidrasi tray* selama 11-16 jam pada suhu -65°C. Gel yang telah direhidrasi dalam *focusing tray* kemudian dijalankan dalam PROTEAN IEF (*Isoelectric Focusing*) dengan voltase bertahap 250 V selama 20 menit (linier), 400 V selama 6 jam (linier) dilanjutkan 800 V selama 2 jam (*rapid*) pada suhu 10 °C (Rousch *et al.*, 2004).

Tahap ekuilibrasi dilakukan berdasarkan prosedur BioRad *manufacture*. IPG *strip* beku dari tahap 1 dimensi dicairkan dalam suhu ruang 10 menit kemudian direndam dalam bufer ekuilibrasi I yang terdiri 6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% gliserol dan 130 mM DTT selama 10-15 menit. Perendaman dilanjutkan dalam bufer ekuilibrasi II (6 M urea, 2% SDS, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 20% gliserol dan 135 mM iodoasetamida) selama 1-3 jam.

Tahap 2 dimensi, *gel strip* yang telah diekuilibrasi, dipisahkan dengan menyisipkan gel di posisi gel penahan pada 10% gel separasi elektroforesis SDS-PAGE, dengan voltase 150 V selama 80 menit. Pewarnaan gel dilakukan dengan pewarna *coomasie blue* (Bollag & Edelstein, 1991). Gel hasil 2D dipindai dengan karakteristik 256 dpi (*dot per inch*) pada *grey level*. Selanjutnya protein yang telah terseparasi dalam berat molekul dan titik isoelektrik, dideteksi menggunakan perangkat lunak Melanie 7.0 dan identifikasi noktah protein target berdasarkan studi bioinformatika dengan program TagIdent dan koleksi data protein yang terdeposit dalam *UniProt Consortium* (*National Center for Biotechnology Information, Structural Bioinformatics Inc, Protein*

Information Resources, European Bioinformatics Institute dan European Molecular Biology Laboratory).

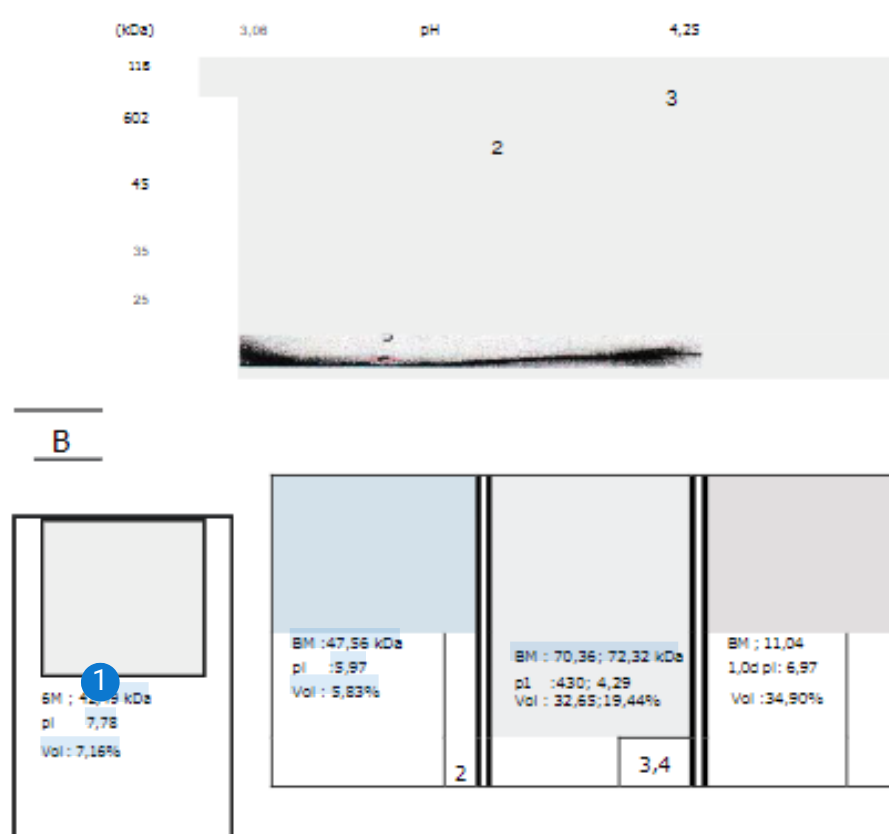
HASIL DAN PEMBAHASAN

Konsentrasi protein silaffin

Rata-rata protein per set diatom dari fase adaptasi atau fase lag hingga fase kematian mencapai kisaran 0.5-10 pg/ set. Hal ini sangat jauh dengan konsentrasi silaffin yang hanya mencapai kisaran 5-50 fg/ set. Konsentrasi yang sangat jauh ini membuktikan bahwa protein silaffin hanya sebagian kecil dari seluruh protein yang dimiliki oleh set diatom, meskipun sangat berperan dalam sintesis silika dinding set diatom.

Karakteristik 2D protein silaffin

Protein silaffin yang diisolasi dengan pelarut HF/NH₄F dari frustule silicasaeous dinding set *C. gracilis* ini telah diketahui mampu mempolimerisasi silika secara in vitro menggunakan substrat TEOS dan telah dikarakterisasi berat molekulnya. Berdasarkan analisis 2 dimensi protein silaffin *C. gracilis* ini mengandung 5 fraksi protein silaffin (Gambar 1), yakni protein Silaffin 1, Silaffin 2, Silaffin 3, Silaffin 4 dan Silaffin 5. Gambar 1B menunjukkan presentasi 3 dimensi noktah tiap fraksi protein dari protein silaffin.



Gambar 1: Analisis 2D terhadap protein silaffin (A), gambar 3 dimensi tiap noktah fraksi protein silaffin (B). BM = berat molekul, pI = titik isoelektrik, Vol.= volume relatif noktah protein

Hasil 2 dimensi terhadap protein silaffin, diperoleh tiga protein dengan berat molekul 43.49 kDa, 47.56 kDa dan 11.04 kDa (Gambar 1B nomor 1, 2 dan 5) yang mempunyai kemiripan dengan

hasil elektroforesis SDS-PAGE (12.06, 23.88, 43.18 dan 44.65 kDa) yang dilakukan oleh Manurung *et al.*, (2007).

Protein ekstrak silaffin tersebut telah terbukti mampu melakukan polimerisasi silika dalam suhu ruang dalam beberapa menit (Manurung *et al.*, 2007). Namun karakteristik tiga protein tersebut tidak memiliki kesamaan BM maupun pI dengan sebagian besar protein silaffin yang telah teridentifikasi dari jenis diatom lainnya (Tabel 1).

Menurut Kroger *et al.*, (1999), protein pembentuk silika diatom dapat memiliki karakteristik molekuler berbeda-beda tergantung jenis diatomnya, karena memiliki struktur atau profit susunan silika yang spesifik untuk masing-masing jenisnya. Berdasarkan data yang terkumpul pada Tabel 1, protein silaffin dapat mengandung beberapa protein silaffin seperti yang dihasilkan diatom *T. pseudonana*. Hal ini memberikan peluang membuat modifikasi reaksi polimerisasi dari fraksi-fraksi protein yang dimiliki sesuai kebutuhan. Di dalam laporan Kroger, *et al.*, (1999) dan Poulsen *et al.*, (2003) dikatakan, bahwa reaksi polimerisasi menggunakan campuran fraksi Sil 2 dan Sil 1A akan menghasilkan pori-pori silika yang berbeda dengan yang hanya dihasilkan dari fraksi Sil 1A. Reaksi *in vitro* dari ekstrak protein silaffin *C. gracilis* tanpa difraksinasi, memberikan struktur silika bentuk sphere.

Satu protein silaffin (Silaffin 2) *C. gracilis* dengan BM 47.56 dan pI 5.97 yang mempunyai kesamaan dengan protein silaffin 2 diatom *Thalassiosira pseudonana* (Q5Y2C1), Kedua jenis diatom tersebut tergolong satu tipe yakni diatom centris. Keduanya memiliki karakteristik protein SIT yang hampir sama. Untuk 2 jenis protein silaffin dari *T. pseudonana* lainnya ternyata tidak memiliki kesamaan dengan 4 protein silaffin *C. gracilis* lainnya. Hal tersebut dapat terjadi, kemungkinan dikarenakan *C. gracilis* dan *pseudonana* memiliki profit struktur nano silika yang berbeda, meskipun dalam satu tipe centris (Round *et al.*, 1990).

Menurut Kroger *et al.*, (1999), protein pembentuk silika diatom dapat memiliki karakteristik molekuler berbeda-beda tergantung jenis diatomnya, karena memiliki struktur atau profit susunan silika yang spesifik untuk masing-masing jenisnya (Tabel 1).

Berdasarkan data yang terkumpul pada Tabel 1, protein silaffin dapat mengandung beberapa protein silaffin seperti yang dihasilkan diatom *T. pseudonana*. Hal ini memberikan peluang membuat modifikasi reaksi polimerisasi dari fraksi-fraksi protein yang dimiliki sesuai kebutuhan. Di dalam laporan Kroger *et al.*, (1999) dan Poulsen *et al.*, (2003) dikatakan, bahwa reaksi polimerisasi menggunakan campuran fraksi Sil 2 dan Sil 1A akan menghasilkan pori-pori silika yang berbeda dengan yang hanya dihasilkan dari fraksi Sil 1A.

Reaksi *in vitro* dari ekstrak protein silaffin *C. gracilis* tanpa difraksinasi, memberikan struktur silika bentuk sphere telah dilakukan oleh Manurung *et al.*, (2007).

Tabel 1. Berat molekul protein silaffin yang telah diketahui dari berbagai jenis diatom

BM (kDa) (pI),	Jenis protein	Jenis diatom	Pustaka/ kode akses (www.expasy.org)
27.50 (10.02)	Silaffin I (nat sill):	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Q9SE35
3.062 (9.92)	Sil 1B		
1.825 (10.00)	SiI1A2		
1.474 (10.18)	Sil AI		
50.74 (5.77)	Silaffin 1	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Q5Y2C2
49.28 (5.71)	Silaffin 2	<i>T. pseudonana</i>	Q5Y2C1
23.96 (9.17)	Silaffin 3	<i>T. pseudonana</i>	Q5Y2C0
24.05 (9.17)	Silaffin TP/ TPS112	<i>T. pseudonana</i> CCMP1335	B8BRK6
3.5 & 35	Silaffin	<i>Chaetoceros didymium</i>	Kroger et al., 2000
6.5, 10; 40	natSillA, natSillB, NatSiI2	<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Poulsen et al., 2003
19, 35	tp sil 1 H, tp sil 2H, tp sil 1 L, tp sil 2L, tp Sil 3	<i>T. pseudonana</i>	Poulsen & Kroger, 2004
12.06; 23.88; 43.18; 44.65	Silaffin	<i>Chaetoceros gracilis</i>	Manurung et al., 2007

KESIMPULAN

Protein yang teridentifikasi sebagai protein yang terlibat dalam silika adalah protein silaffin dengan karakteristik spesifik untuk jenis diatom *Chaetoceros gracilis*, yakni mengandung 5 fraksi protein yang terlibat dalam pembentuk silika. Protein silaffin tersebut disebut sebagai Silaffin 1 (BM 43.49 kDa, pI 7.78); Silaffin 2 (BM 47.56 kDa, pI 5.97); Silaffin 3 (BM 70.36 kDa, pI 4.30); Silaffin 4 (BM 72.32 kDa, pI 4.29) dan Silaffin 5 (BM 11.04 kDa, pI 6.97).

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Yayasan Sanjaja yang telah memberikan dana sebagian dari penelitian ini dan Pusat Penelitian dan Pengkajian Oceanologi LIPI-Jakarta yang telah memberikan kultur diatom.

DAFTAR PUSTAKA

- Bollag DM, Edelstein SJ. 1991. *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss.
- Kroger N, Deutzmann R, Sumper M. 1999. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science* 286:1129-1132.
- Kroger N, Lorenz S, Brunner E, Sumper M. 2002. Self-assembly of highly phosphorylated silaffins and their function in biosilica morphogenesis. *Science* 298:584-586.
- Maeda E, Komatsu M. 1996. The thermoelectric performance of silicon carbide semiconductor made from rice hull. *Mater Res Soc Sym Proc* 410:77-82.
- Manurung AI, Pratiwi AR, Syah D, Suhartono MT. 2007. Isolation and Characterization of Silaffin that Catalyze Biosilica Formation from Marine Diatom *Chaetoceros gracilis*. *Hayati J Biosci* 14:119-122.

Philips CI, Bagyo M. 2005. • Micro review proteomic meets microbiology technical advance in the global mapping of protein expression and function. *Cell Microb* 8:1061-1076.

Poulsen N, Sumper M, Kroger N. 2003. Biosilica formation in diatoms: characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *PNAS* 100 (21):12075-12080.

Poulsen N, Kroger N. 2004. Silica morphogenesis by alternative processing of silaffin in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J Biol Chem* 279: 42993-42999.

Richardson. 2001. Gases at The Heart of Semiconductor Production. Rerhubungberkalat http://www.electronic.comuse.auielcifeature_articleitem_102001b.asp [6 Jan 2009]

Round FE, Crawford RM, Mann DG. 1990. *The diatom*. USA: Cambridge University.

Rousch JM, Bingham SE, Sommerfeld MR. 2004. Protein expression during heat stress in thermo-intolerant and thermo tolerant diatoms. *J Exp Mar Bio Eco*. 306: 231-243