

KARAKTERISTIK PROTEIN SERUPA SILICATEIN DARI SPONGE ASAL PERAIRAN NIAS DAN LOMBOK¹⁾

*(Characteristic of Silicatein-like Protein Sponge from
Nias and Lombok Marine)*

M.R.R. Lukie Trianawati, Maggy T. Suhartono²⁾,
Dahrul Syah²⁾, dan Ekowati Chasanah²⁾

ABSTRACT

Silica, a polymerized silicon dioxide, is widely used as raw materials for food industries, such as food packaging, filter agent, biomarkers and biosensor for various analysis. In biological sistem such as sponge, the formation of silica structure was directed by protein known as silicatein. The aims of this research were to extract silicatein-like protein isolated from sponge live surrounding the Nias and Lombok seacost Indonesia and to study their activity to polymerize tetraethoxyorthosilicate (TEOS) in-vitro. Protein in silica spicule was isolated by collecting silica spicule, soaked in HF/NH₄F buffer (pH5.0) for dissolving silica and releasing this protein. The protein was analysed by electrophoresis SDS-PAGE to estimate the molecular weight and the concentration was analyzed by Bradford method. The highest yield of silica spicula was 58.5% of dry weight sponge that was isolated from sponge MT37. By SDS-PAGE, the molecular weight of protein from N6 showed three bands of 32, 27, 23 kDa, while MT5 protein was 15.5 kDa, and MT37 protein was 18 kDa. The highest polymerization activity was 144 μ mol/ml TEOS occurs at 12 hours, showed by protein isolated from sponge MT37 of Lombok Marine.

Key words: sponge, silicatein like-protein, tetraethoxyorthosilicate

PENDAHULUAN

Saat ini pemakaian alat-alat dan bahan yang memanfaatkan struktur nano semakin banyak. Salah satu bahan berstruktur nano yang banyak penggunaannya adalah silika yang sering disebut juga sebagai nanosilika atau silika nanosphere. Struktur seperti inilah yang saat ini terus berkembang pemakaiannya di industri pangan, kosmetik, medis, dan elektronik.

Khusus dalam industri pangan, silika yang berstruktur nano dimanfaatkan untuk menghasilkan kemasan aktif, penjernih/filter, antikoagulan, dan bahan dasar *chip* untuk biosensor. Data dari Helmut Keiser menyebutkan penjualan produk kemasan makanan dan minuman berstruktur nano melonjak pada tahun 2004 sebesar US \$860 m dari US \$ 150 m pada tahun 2002. *Lux Research* mencatat bahwa perusahaan raksasa seperti Kraft, Altria, dan Unilever juga mengaplikasikan '*smart packaging*' karena lebih bersifat *inert* (tidak bereaksi), tahan terhadap suhu tinggi dan oksigen, tahan terhadap bakteri dan virus, serta berpenampilan menarik (El Amin, 2005).

¹⁾ Bagian dari tesis penulis pertama, Program Studi Ilmu Pangan, Sekolah Pascasarjana IPB

²⁾ Beturut-turut Ketua dan Anggota Komisi Pembimbing

Beberapa kendala selama proses pembuatan silika yang berstruktur nano saat ini adalah proses yang harus menggunakan kondisi ekstrim, yaitu kondisi yang sangat asam atau basa, memerlukan suhu dan tekanan yang tinggi, serta menggunakan surfaktan yang dapat mencemari lingkungan. Beberapa penelitian yang bertujuan untuk mengurangi bahaya terhadap lingkungan dalam proses pembuatan silika berstruktur nano terus dikembangkan, salah satu di antaranya adalah eksplorasi pembuatan biosilika.

Biosilika merupakan struktur nano silika yang dibuat oleh organisme secara alamiah, di antaranya oleh biota laut seperti sponge (*Phylum porifera*) dan diatom (*Bacillariophyta*). Sponge laut mampu membentuk struktur padat silika mulai dari skala kecil (nano) dengan morfologi yang teratur dan spesifik yang merupakan hasil pengontrolan secara genetik. Pembentukan struktur silika pada sponge dapat terjadi pada kondisi suhu dan tekanan yang ambient dan pH netral.

Pada sponge, pembentukan struktur silika ini melibatkan suatu protein yang dikenal dengan protein *silicatein* yang pertama kali diisolasi dari sponge *Tethya aurantia* (Cha *et al.*, 1999). Filamen protein terdapat di bagian *center core* dari *striated shell* spikula silika yang terdiri dari lapisan-lapisan silika (Aizenberg, 2005). Saat terjadinya pengumpulan silika di dalam sel sklerosit, filamen protein yang tidak bersilika dan bersilika terdapat di dalam sel yang sama. Oleh karena itu, filamen protein ini diduga berperan dalam pengumpulan silika (Shimizu *et al.* 1998). Penelitian yang telah dilakukan Nurjanah (2006) menunjukkan bahwa protein yang diisolasi dari sponge ST1 memiliki potensi yang tinggi sebagai katalis biologis untuk polimerisasi silika. Aktivitas tertinggi dari sponge ST1 adalah sebesar 22.4 $\mu\text{mol/ml}$ TEOS dengan lama inkubasi selama 12 jam.

Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi, karakterisasi protein, dan analisis reaksi protein serupa *silicatein* dari sponge N6 dan N20 dari perairan Pulau Nias dan sponge MT5, MT36, dan MT37 dari perairan Pulau Lombok.

METODE PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Biokimia, PAU Bioteknologi IPB dan Laboratorium Material Science UI. Penelitian ini dilakukan dari bulan Desember 2005 sampai Agustus 2006.

Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah sponge yang diambil dari koleksi Balai Riset Pengolahan Produk Perikanan dan Bioteknologi Kelautan, DKP, yang berasal dari perairan Nias dan Lombok. Bahan kimia penting yang digunakan adalah TEOS (Sigma), HF (Sigma), NH_4F (Merck), pereaksi Bradford, pereaksi untuk SDS/PAGE, dan pereaksi untuk *colorimetric molybdate assay*.

Alat utama yang digunakan adalah spektrofotometer UV/Vis *double beam* (Hitachi), *High Speed Centrifuge* CR21G (Hitachi), dan perangkat elektroforesis Mini-Protean III (Bio-Rad).

METODE PENELITIAN

Pengumpulan sampel sponge

Sponge diambil dari perairan Pulau Nias dan Lombok pada kedalaman 10-15 m oleh tim penyelam dari Departemen Kelautan dan Perikanan RI. Sponge dibawa dalam kondisi beku selama distribusi ke laboratorium.

Isolasi protein dari spikula silika sponge

Isolasi protein dilakukan dengan terlebih dahulu mengisolasi spikula silika dari sponge (modifikasi Nurjanah, 2006). Sponge sebanyak 100g dicuci dengan air laut, dipotong dengan ukuran 1 cm³. Setelah direndam dalam larutan NaOCl 10% 200 ml selama 2 jam dan 3N HNO₃:3N H₂SO₄ (1:4) 200 ml selama 24 jam dan hasilnya dicuci dengan aquades sampai pH 6, kemudian dipresipitasi dengan aseton.

Protein serupa silicatein diperoleh dengan memisahkan spikula silika dalam *buffer* 2M HF/ 8M NH₄F (pH 5.0). Untuk 1 g spikula silika kering dilarutkan dalam 50 ml *buffer* selama 2 jam. *Buffer* HF dihilangkan dengan dialisis, selanjutnya dialisis disentrifugasi pada 12 000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C.

Karakterisasi protein

Penentuan kadar protein dilakukan dengan menggunakan Metode Bradford (Dunn, 1989). Protein sebanyak 100 µl direaksikan dengan 2 ml larutan Bradford (1:19). Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 565 nm.

Penentuan jumlah filamen protein dihitung menggunakan *hemacytometer* (Fardiaz, 1989). Sebanyak 1 ml suspensi protein diletakkan di gelas obyek *hemacytometer*, selanjutnya dihitung jumlah filamen protein dalam 1 ml.

Penentuan bobot molekul ditentukan dengan menggunakan SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Digunakan standar marker bobot molekul rendah (*low molecular weight*) dan gel diwarnani dengan *silver staining* (Nolan, 1996).

Analisis reaksi protein serupa silicatein

Uji aktivitas dilakukan dengan mereaksikan 250 µl suspensi protein dalam *buffer* Tris-HCl pH 6.8 dengan 1ml TEOS 13.5 µmol/ml, kemudian digoyang menggunakan *shaker* pada suhu 26°C selama 12 jam. Hasil reaksi disentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 25 menit. Pelet dicuci dengan etanol 50%, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 5 menit. Pelet dilarutkan dalam 1 ml NaOH 1M pada 85-95°C selama 30 menit yang dilanjutkan pada suhu kamar selama 36 jam. Penghitungan asam silikat dihitung dengan modifikasi *colorimetric molybdate assay* (Brzezinski dan Nelson, 1986).

Analisis SEM

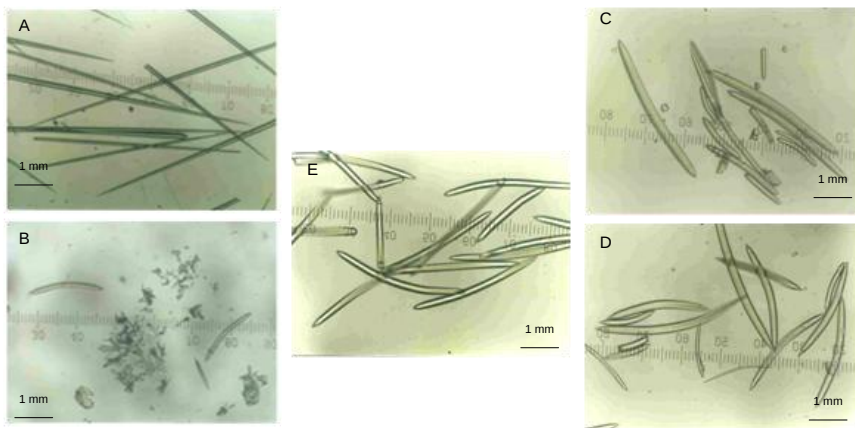
Analisis struktur polimer silika dilakukan dengan menggunakan *scanning electron microscopy* (SEM) JEOL JSM-5310LV yang sebelumnya *dicoating* dengan JEOL JFC-1200 *Fine Coater*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bentuk dan rendemen spikula silika

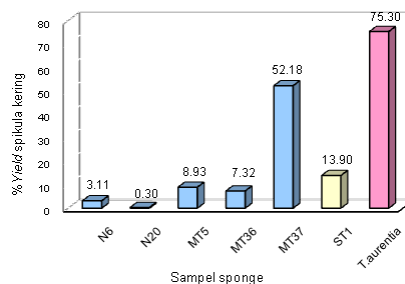
Pada Gambar 1 tampak bahwa tipe bentuk spikula silika yang berhasil diisolasi dari N6, N20, MT5, MT36, dan MT37 mempunyai tipe yang hampir sama, yaitu berbentuk monakson (jarum).

Ukuran spikula silika dari kelima sampel juga hampir sama, yaitu megascleres (besar) yang merupakan salah satu ciri dari sponge kelas *Demospongiae* (Brusca and Brusca, 1990). Spikula silika N6 mempunyai ukuran yang paling besar, yaitu 1 cm sedangkan N20, MT5, MT36, dan MT37 mempunyai ukuran yang hampir sama, yaitu sekitar 2.5-5 mm. Diameter spikula hampir sama dengan ukuran spikula silika yang dijumpai pada *T. Aurantia*, yaitu berdiameter sekitar 30 μ m (Shimizu, 1998).



Gambar 1. Spikula silika N6 4x (A), N20 200x (B), MT5 200x (C), MT36 200x (D), dan MT37 200x(E)

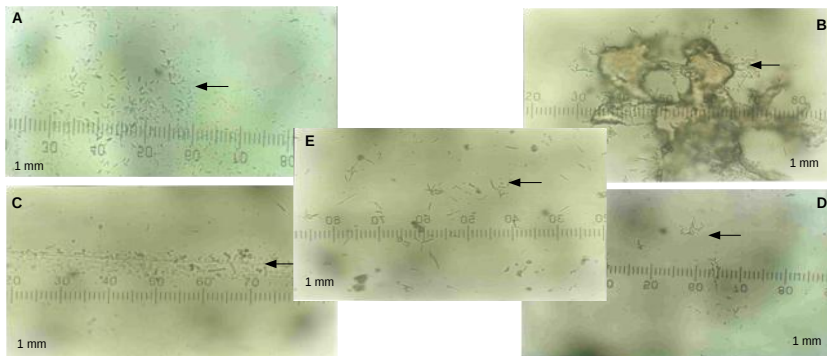
Rendemen spikula silika tertinggi diperoleh dari sponge MT37, yaitu sebesar 51.8% dari bobot kering sponge (Gambar 2). Jumlah rendemen tertinggi masih di bawah jumlah rendemen spikula silika dari *T. Aurentia*, yaitu 72.58% (Shimizu, 1998). Dari sponge N6, N20, MT5, dan MT36 diperoleh rendemen spikula sebanyak 3.11%, 0.30%, 3.93%, dan 7.32% dari bobot kering sponge.



Gambar 2. Grafik perbandingan rendemen spikula silika dari sponge N6, N20, MT5, MT36, dan MT37

Bentuk dan Karakterisasi Protein

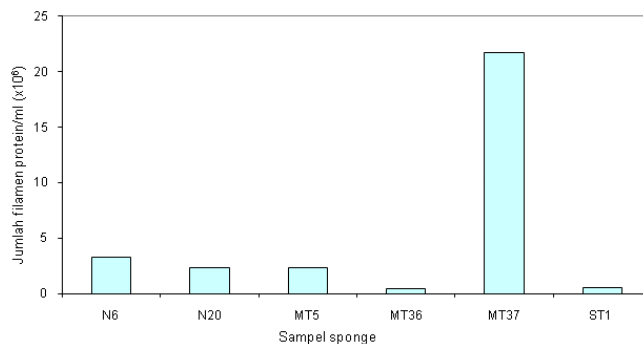
Hasil penelitian Shimizu *et al.* (1998) menunjukkan bahwa protein *silicatein* dari *T. aurentia* berbentuk batang dengan panjang sekitar 1 mm dan diameter 2 μm . Seperti yang tampak pada Gambar 3, hasil pengamatan di bawah mikroskop terlihat bahwa bentuk protein serupa silicatein yang berhasil diisolasi dari kelima sponge juga berbentuk batang dengan panjang sekitar 0.1-0.4 mm dan diameter $\pm 10 \mu\text{m}$. Untuk mengeluarkan protein dilakukan pelepasan silika penyusun spikula dengan menggunakan larutan *buffer* HF/ NH_4F . Senyawa HF merupakan senyawa yang dapat menyerang ikatan antara Si dan oksigen pada polimer SiO_2 dari silika spikula. Untuk mencegah kerusakan protein digunakan garam NH_4F .



Gambar 3. Filamen protein sponge N6 (A), N20 (B), MT5 (C), MT36 (D), dan MT37 (E) pada perbesaran 400X

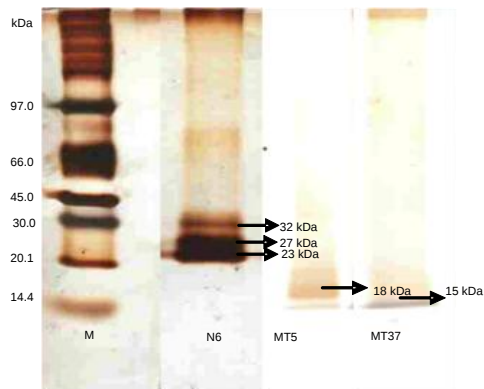
Hasil analisis kadar protein menggunakan metode Bradford diperoleh kadar protein tertinggi dari MT37, yaitu sebanyak 0.12 mg, sedangkan kadar protein dari N6, MT5, dan MT36 berturut-turut adalah 0.012 mg, 0.042 mg, dan 0.05 mg.

Hasil analisis ini dikonfirmasi dengan penghitungan jumlah filamen protein menggunakan *Haemocytometer* (Gambar 4), jumlah filamen protein tertinggi adalah sponge MT37, yaitu $2.17 \times 10^8/\text{ml}$. Hasil ini lebih tinggi jika dibandingkan dengan jumlah filamen protein dari ST 1, yaitu 2.25×10^6 per ml (Nurjanah, 2006).



Gambar 4. Jumlah filamen protein dari sponge N6, N20, MT5, MT36, MT37, dan ST1

Semua sampel dianalisis bobot molekul protein yang terisolasi dengan SDS-PAGE, tetapi hanya protein dari N6, MT5, dan MT37 yang terdeteksi (Gambar 5). Protein sponge N6 mempunyai tiga pita yang masing-masing berukuran 32, 27, dan 23 kd, sedangkan dari sponge MT5 dan MT37 pita yang terukur adalah 15.5 dan 18.1 kd. Protein yang tidak terdeteksi kemungkinan disebabkan konsentrasi proteinnya yang terlalu rendah, yaitu di bawah 2 ng/ml yang merupakan batas deteksi terendah *silver staining*.



Gambar 5. Hasil SDS-PAGE Marker LMW, protein N6, MT5, dan MT37

Analisis Reaksi Protein dengan Substrat TEOS

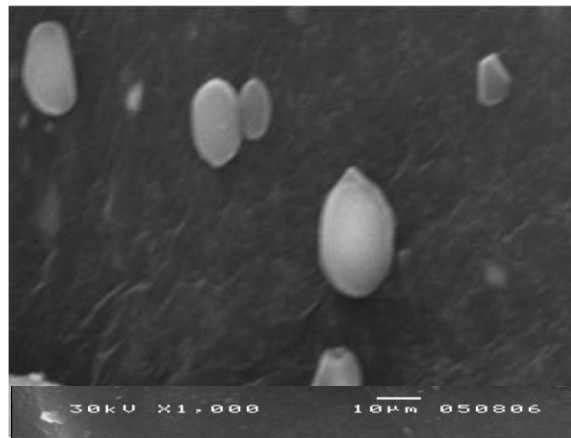
Analisis reaksi protein dengan substrat *tetraethoxyorthosilicate* dilakukan untuk mengetahui adanya potensi katalis biologis polimerisasi silika. Senyawa TEOS yang digunakan sebagai substrat merupakan senyawa Si dengan empat tangan yang mengikat O-Etanol. Substrat ini memiliki kemiripan struktur dengan substrat alami, yaitu asam silikat ($\text{Si}(\text{OH})_4$), tetapi lebih stabil pada pH netral (Cha *et al.*, 1999).

Tabel 1. Perbandingan jumlah TEOS terpolimerisasi

Sponge sumber protein	Kondisi reaksi				Jumlah filamen protein ($\times 10^6$)	Jumlah TEOS terpolimerisasi		
	Lama reaksi (menit)	[TEOS] (μmol)	Volume protein (μl)	Kadar protein ($\mu\text{g/ml}$)		Total (μmol)	Per menit (μmol)	Per ml protein (μmol)
MT37	720	13.5	250	120	217.00	144.0	0.200	0.58
MT5	720	13.5	250	42	2.35	65.2	0.091	0.26
ST1	720	4 500	250		0.56	15.9	0.022	
ST3	720	4 500	250		1.50	3.0	0.004	
<i>T. aurentia</i>	15	4 500	600	100		214.0	14.267	0.36

Pada Table 1 terlihat bahwa berdasarkan jumlah suspensi protein yang dipakai, aktivitas protein dari sponge MT37 lebih tinggi jika dibandingkan dengan hasil polimerisasi oleh protein silicatein *T.aurentia*. Akan tetapi, jika dilihat dari hasil per menit, aktivitas protein dari MT37 masih lebih kecil daripada aktivitas protein silicatein dari *T. aurentia*. Hal ini sangat dimungkinkan karena konsentrasi substrat yang direaksikan juga jauh lebih kecil, yaitu 13.5 $\mu\text{mol/ml}$.

Hasil analisis struktur permukaan polimer silika menggunakan SEM (Gambar 7) memperlihatkan bahwa sol gel silika yang berupa partikel bola telah terbentuk dengan ukuran sekitar 5-20 μm . Hasil SEM yang tampak pada Gambar 7 menunjukkan bahwa reaksi baru terjadi pada tahap dua, terlihat dari adanya bola-bola yang tersebar yang merupakan perpanjangan hasil polimerisasi monomer-monomer TEOS. Kemungkinan berikutnya reaksi akan memasuki tahap ketiga yang terlihat dari adanya agregasi partikel-partikel bola. Menurut Iller (1979), proses polimerisasi dan kondensasi silika melibatkan tiga tahap, yaitu (1) polimerisasi dari monomer-monomer asam silisik membentuk nuklei yang stabil dengan bentuk yang kritis, (2) perpanjangan nuklei-nuklei tersebut membentuk partikel-partikel seperti bola, dan (3) terjadi agregasi partikel-partikel bola tersebut membentuk rantai atau suatu motif yang berstruktur.



Gambar 7. SEM nuklei polimer silika pada tahap 1 (A) dan agregat nuklei polimer silika (B)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa bobot molekul protein serupa silicatein dari N6 berukuran 32, 27, dan 23 kDa, sedangkan bobot molekul protein dari MT5 dan MT37 adalah 15.5 kDa dan 18 kDa.

Di antara kelima sampel, sponge MT37 mempunyai potensi paling tinggi sebagai katalis biologis polimerisasi dari substrat TEOS, yaitu sebesar 144 $\mu\text{mol/ml}$ dengan lama reaksi 12 jam. Karakter kinetika reaksi protein dari MT37 mengikuti kinetika Michaelis-Menten dengan nilai K_m sebesar 47.59 $\mu\text{mol/ml}$ dan V_{max} sebesar 4.7 $\mu\text{mol/jam}$. Dari analisis SEM diketahui bahwa diameter nuklei polimer silika yang dihasilkan oleh protein MT37 berukuran sekitar 5-20 μm .

Saran

Selama penelitian ini didapatkan beberapa ide yang disarankan, yaitu perlunya dilakukan kajian kinetika yang lebih dalam untuk mengetahui kondisi-kondisi yang dapat meningkatkan hasil polimerisasi. Selain itu, penelitian biomolekuler penting dilakukan dalam usaha memanipulasi jumlah dan aktivitas protein.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Lab MB-PAU IPB, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, DKP, dan Tim Penelitian Dasar atas dukungan moral dan material dalam pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Aizenberg, J., Sundar, V.C., Yablon, A.D., Weaver, J.C., and Chen, G. 2004. Biological glass fibers: Correlation between optical and structural properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101 (10):3358-3363.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye-binding. *Anal Biochem*. 72:234-254.
- Brezinski, M.A. and Nelson, D.M. 1986. *Mar. Chem.* 19:139-151.
- Brusca, R.C. and Brusca, G.J. 1990. Invertebrates. Sunderland, USA: Sinauer Associates. Inc. Publ.
- Cha, J.N., Shimizu, K., Zhou, Y., Christiansen, S.C., Chmelka, B.F., Stucky, G.D., and Morse, D.E. 1999. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96 (2):361-365.
- Dunn, M.J. 1989. Determination of total protein concentration. In Harris, E.L. and Angal, S. (eds): Protein Purification Methods.). England, Oxford: IRL Press.
- El Amin, A. 2005. Nanotechnology targets new food packaging products. [www.foodnavigator.com/news/ng.asp?id=63147\(12](http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?id=63147(12) Oktober 2005).
- Fardiaz, S. 1989. Mikrobiologi Pangan. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Pusat Antar Universitas Bioteknologi.
- Iller, R.K. 1979. The Chemistry of Silica: Solubility, polymerization, colloid, and surface properties and biochemistry. New York: Wiley Interscience.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Nolan, K. 1996. Silver staining protein gels: The short method. [http:// mcardle.oncology.wisc.edu/burgess/protocols/quicksilver.html](http://mcardle.oncology.wisc.edu/burgess/protocols/quicksilver.html) (5 Desember 2005).
- Nurjanah, S. 2006. Eksplorasi protein silicatein dari sponge asal perairan Biunuangeun.
- Palmer, T. 1991. *Understanding Enzymes* 3rd Ed. New York: Ellis Horwood.
- Shimizu, K., Cha, J., Stucky, G.D., and Morse, D.E. 1998. Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl. Acad Sci*. 95(11):6234-6238.
- Suhartono, M.T. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Jakarta: Dirjen Pendidikan Tinggi, Depdikbud, Institut Pertanian Bogor, Pusat Antar Universitas.
- Zhou, Y., Shimizu, K., Cha, J.N., Stucky, G.D., and Morse, D.E. 1999. Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis by Silicatein α Requires Specific Hydroxy and Imidazole Functionalities. *Angew Chem. Int. Ed*. 38 No.6.